

Année 1981 N. 46

**AROMATHÉRAPIE — ÉTUDE ANALYTIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
D'UNE SPÉCIALITÉ A BASE D'HUILES ESSENTIELLES :
EFFET SUR LA SENSIBILITÉ DE LA SOURIS
A UNE INFECTION GRIPPALE EXPÉRIMENTALE**

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard de Lyon

(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 30 juin 1981

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Catherine RICHARD épouse PÉPIN

née le 4 octobre 1957

à Saint-Souplet-sur-Py



Année 1981 N. 46

**AROMATHÉRAPIE — ÉTUDE ANALYTIQUE ET PHARMACOLOGIQUE
D'UNE SPÉCIALITÉ A BASE D'HUILES ESSENTIELLES :
EFFET SUR LA SENSIBILITÉ DE LA SOURIS
A UNE INFECTION GRIPPALE EXPÉRIMENTALE**

THESE

présentée

à l'Université Claude-Bernard de Lyon

(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 30 juin 1981

pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

Catherine RICHARD épouse PÉPIN

née le 4 octobre 1957

à Saint-Souplet-sur-Py



1907

AROMATHERAPY - STUDY AND PRACTICE OF ESSENTIAL OILS
OF THE SPECIALITY OF THE ESSENTIAL OILS
EFFECT AND THE BENEFITS OF THE ESSENTIAL OILS
A NEW METHOD OF ESSENTIAL OILS

THESE

1907

1907

1907

1907

1907



1907

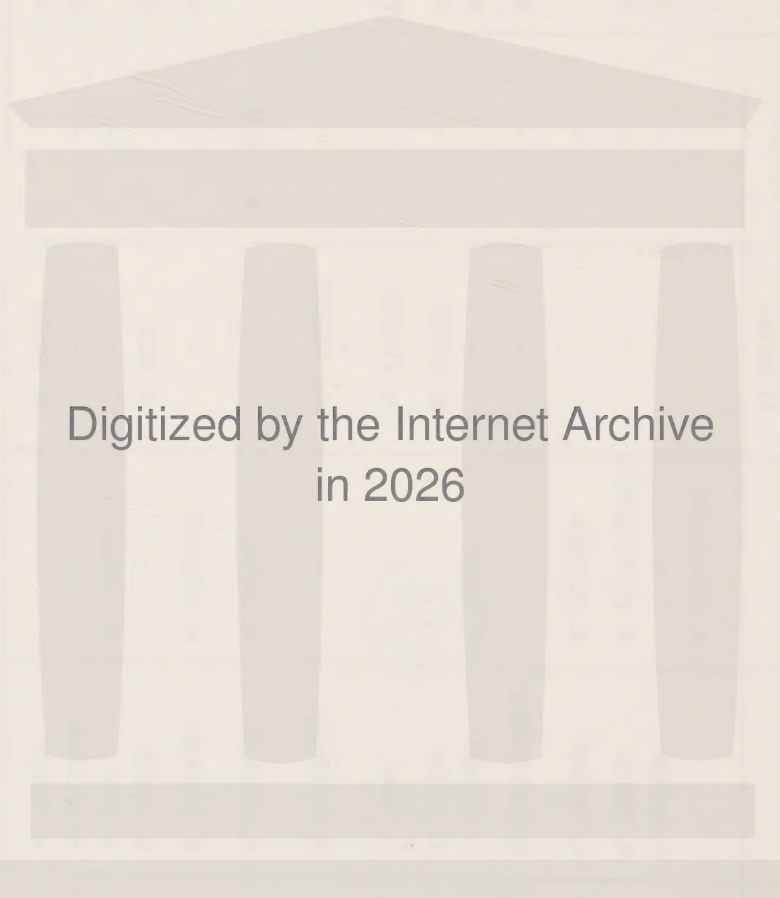
1907

1907



Directeur : Professeur Ph. COTTEREAU

C H A I R E S	Professeurs	Professeurs sans chaire	Maîtres de conférences 11 postes	Maîtres Assistants Agrégés	Maîtres Assistants 20 postes	Assistants
Alimentation	-	M. JEAN-BLAIN	-	-	-	M. GRANCHER
Anatomie	M. BARONE	-	-	-	M. DENOIX	M. DELTOUR
Chirurgie	M. COULON	M. LE NIEUX-ANNEN	-	-	M. FAU	M. DULAC
Histologie - Anatomie pathologique	M. TISSEUR	M. GASTELLU	-	-	-	Mme GRANCHER
Hygiène et industrie des aliments d'origine animale	M. CHANTEGRELET	-	-	-	M. DEMONT	M. DROMIGNY
Maladies contagieuses	M. JOUBERT	M. PRAVE	-	-	M. CHOMEL	M. DUCLOS
Parasitologie	M. EUZEBY	-	M. GEVREY	-	Mme CHAUVÉ	M. NGO TAN HUNG
Pathologie générale - Microbiologie - Immunologie	M. OUDAR	-	M. RICHARD	-	M. EUZEBY	M. GUERIN
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour	M. COTTEREAU	-	Mme BRUGERE	-	-	M. THIN
Pathologie médicale des équidés et des carnivores	M. FONTAINE	M. LAPRAS	-	M. LEGEAY	-	M. BOUVIER
Pathologie de la reproduction	M. BERTRAND	M. DESCHANEL	-	-	Mme RACHATIL	M. PEPIN
Pharmacie-Toxicologie	M. LORGUE	-	M. KECK	-	M. JAUSSAUD	Mme PEPIN
Physiologie	M. BOST	M. BOIVIN	-	-	-	M. THIEBAULT
Physique-Chimie	M. DELATOUR	-	-	-	M. GARNIER	Mlle MARTIN
Zootéchnie	M. FROGET	-	M. FRANCK	-	Mlle COURSAT	-
C.F.T.S.V.	M. FLACHAT	7	5	1	10	14
	14					



Digitized by the Internet Archive
in 2026

JURY DE THESE

PRÉSIDENT DU JURY

Monsieur le Professeur BERTOYE
de la FACULTE DE MEDECINE DE LYON

1ER ASSESSEUR

Monsieur le Professeur LORGUE
de l'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

2ÈME ASSESSEUR

Monsieur KECK
Maître de Conférences
à l'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON

AROMATHÉRAPIE -

ETUDE ANALYTIQUE ET PHARMACOLOGIQUE D'UNE SPÉCIALITÉ
À BASE D'HUILES ESSENTIELLES : EFFET SUR LA SENSIBILITÉ
DE LA SOURIS À UNE INFECTION GRIPPALE EXPÉRIMENTALE.

S O M M A I R E

INTRODUCTION

1ÈRE PARTIE : AROMATHERAPIE - DONNEES GENERALES

I. DÉFINITION

II. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES ESSENCES DES PLANTES

II.1. Définition

II.2. Méthodes d'obtention

II.3. Caractères physico-chimiques des huiles essentielles

II.4. Qualité des huiles essentielles

III. LE CONCEPT DE TERRAIN ET DE MALADIE EN AROMATHÉRAPIE

III.1. Définition du terrain

III.2. La notion de maladie en aromathérapie

III.3. L'aromatogramme

Définition

Technique

Valeur

L'indice aromatique

III.4. Méthodes en aromathérapie

2ÈME PARTIE : DONNEES EXPERIMENTALES

(A) ANALYSE DE LA SPECIALITÉ AROMATHÉRAPIQUE

I. DESCRIPTION ET FORMULE INTÉGRALE DE LA SPÉCIALITÉ

I.1. Caractères

I.2. Composition

I.3. Origines et propriétés des essences

II. CONTRÔLE ANALYTIQUE DU PRODUIT FINI

II.1. Essais

II.2. Dosage des principaux constituants de la spécialité

- 1) *Solution étalon pour l'identification des constituants*
- 2) *Solution essai*
- 3) *Conditions chromatographiques*
- 4) *Mode opératoire*

III. RÉSULTATS ET EXAMENS CRITIQUES DES MÉTHODES PROPOSÉES

III.1. Résultats

III.2. Valeurs des méthodes proposées

- 1) *L'identification des principes actifs*
- 2) *Le dosage des principes actifs*

(B) EFFET DE LA PRÉPARATION SUR LA SENSIBILITÉ DE LA SOURIS À UNE INFECTION GRIPPALE EXPÉRIMENTALE

* Première phase : recherche d'un éventuel effet protecteur

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Les animaux

I.2. L'infection virale

- 1) *Choix de l'infection virale*
- 2) *Description de l'infection virale*

I.3. Méthodologie

- 1) Essais préliminaires de distribution de la substance
- 2) Modalité finale de distribution de la substance
- 3) Réalisation des différents lots
- 4) Inoculation du virus
- 5) Période d'observation

I.4. Etude statistique

II. RÉSULTATS

II.1. Traitement préventif à dose simple

1).2).3) Dilutions $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$ du virus

II.2. Traitement préventif à dose double

1). 2) Dilutions $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$ du virus

II.3. Traitement curatif à dose simple

1). 2). 3) Dilutions $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$ du virus

II.4. Traitement curatif à dose double

1).2).3) Dilutions $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$ du virus

III. DISCUSSION

III.1. Symptômes

III.2. Mortalité

III.3. Examen pondéral

III.4. Autopsie

* Deuxième phase : épreuve de confirmation

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Méthodologie

- 1) *Distribution de la substance*
- 2) *Réalisation des différents lots*

II. RÉSULTATS

II.1. Traitement préventif, dilution $\frac{1}{10}$ du virus

II.2. Traitement curatif, dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

III. DISCUSSION

III.1. Symptômes

III.2. Mortalité

III.3. Examen pondéral

III.4. Autopsie

CONCLUSION

Bibliographie

I N T R O D U C T I O N

Connues depuis la plus haute antiquité pour leurs propriétés thérapeutiques, les plantes ont toujours été considérées, tout au long de l'histoire de la médecine comme un des principaux moyens d'obtenir la guérison, qu'elles soient administrées sous forme de préparations plus ou moins élaborées : infusions, emplâtres, etc..., ou sous forme d'extraits : les huiles essentielles.

Oubliée pendant de nombreuses années, l'aromathérapie suscite à l'heure actuelle un regain d'intérêt, aussi bien dans l'opinion publique qu'au sein de la communauté scientifique ; médecine parallèle à la médecine traditionnelle, elle apparaît souvent plus "douce".

Dans ce cadre nous avons étudié une préparation à base d'essences aromatiques. Dans un premier temps, nous avons réalisé une mise au point de méthodes analytiques, en les appliquant en particulier à cette préparation, puis dans un deuxième temps, nous avons recherché les effets de cette substance sur la sensibilité de la souris à une infection grippale expérimentale.

Avant de rapporter le protocole expérimental et les résultats obtenus, nous rappellerons quelques données fondamentales concernant l'aromathérapie.

PREMIERE PARTIE :

AROMATHERAPIE .

DONNEES GENERALES.

AROMATHÉRAPIE - DONNÉES GÉNÉRALES

Les données générales que nous allons exposer proviennent d'une étude bibliographique réalisée essentiellement à partir des ouvrages suivants :

- BELAICHE (P.) - Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie - Tome 1
L'aromatogramme.
Maloine S.A. - 1979.
- BEZANGER-BEAUQUESNE (L.), PINKAS (M.), TORCK (M.) - Les plantes dans
la thérapeutique moderne.
Maloine S.A. - 1975.
- VALNET (J.) - Aromathérapie : traitement des maladies par les essences
des plantes - 9ème édition.
Maloine S.A. - 1980.
- VALNET (J.), DURAFFOURD (C.), LAPRAS (J.C.) - Phytothérapie et
Aromathérapie.
Presses de la Renaissance - 1978.

I. DÉFINITION

On entend par aromathérapie le traitement des maladies par les essences de plantes.

II. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES ESSENCES DE PLANTES (OU HUILES ESSENTIELLES)

II.1. DÉFINITION

Les essences aromatiques, ou huiles essentielles, sont des composés aromatiques et volatils retirés du règne végétal.

II.2. METHODES D'OBTENTION

On obtient les huiles essentielles par trois procédés principaux :

- la distillation : les plantes à essences sont distillées et les principes volatils entraînés par la vapeur d'eau.

- l'expression : employée uniquement pour les agrumes ; le zeste comprenant des petites vésicules d'essence est séparé du fruit et soumis à une extraction sous pression.
- l'extraction par solvant : on dissout les principes aromatiques, les pigments de plante fraîche dans un solvant organique volatil, l'évaporation du solvant laisse un résidu cireux, très aromatique, qui, purifié par l'alcool donne une essence appelée absolue.

Les différentes méthodes utilisées pour extraire les huiles essentielles des plantes, conduisent à des produits présentant des compositions très différentes. Les pharmacopées n'admettent comme procédés d'extraction que l'entraînement à la vapeur ou l'expression.

Notons enfin, qu'il existe un grand nombre de plantes non productrices d'essences ou productrices d'une quantité insuffisante pour qu'on puisse l'extraire.

II.3. CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

- . Point d'ébullition : de 160° à 240° C
- . Densité : de 0,759 à 1,096
- . Activité optique : dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée
- . Couleur : incolores généralement, mais certaines sont colorées (ex. : essence de camomille en bleu, essence de cannelle en rouge).

Composition chimique

Le nombre des composants isolés au sein des huiles essentielles est d'environ un millier et il en reste encore beaucoup à découvrir. Cependant, on peut classer les huiles en fonction de leur constituant principal :

- Hydrocarbures terpéniques et sesquiterpéniques
ex. : huiles essentielles de citron, de genévrier
- Alcools
ex. : huiles essentielles de coriandre, de rose, de géranium, etc..

- Mélange d'esters et d'alcools
ex. : huiles essentielles de lavande (linalol - acétate de linalyle),
de menthe.
- Aldéhydes
ex. : huile essentielle de cannelle (aldéhyde cinnamique)
- Cétones
ex. : huile essentielle de sauge (thuyone)
- Phénols
ex. : huile essentielle de thym (thymol), de girofle (eugénol), etc...
- Ethers
ex. : huile essentielle de cajepout (eucalyptol)
- Constituants divers, par exemple des peroxydes (ascaridol de l'huile
essentielle de chénopode).

En raison de leur richesse en terpènes, en phénols, en alcools, en aldéhydes, les essences naturelles sont, en général, considérées comme douées de propriétés antiseptiques. Néanmoins, on peut leur reconnaître bien d'autres propriétés pharmacologiques : cholagogues, sédatives, expectorantes, antispasmodiques, etc...

II.4. QUALITE DES HUILES ESSENTIELLES

La qualité des huiles essentielles dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels la provenance, le procédé d'obtention, l'état de maturation et de conservation de la plante.

Ainsi, il existe des "crus" reconnus d'essences : cannelle de Ceylan, verveine des Indes, thym de la Réunion, etc...

Pour posséder leur pleine action, les plantes doivent donc provenir de bons terroirs, avoir été récoltées en temps opportun, préparées et conservées avec art.

III. LE CONCEPT DE TERRAIN ET DE MALADIE EN AROMATHÉRAPIE

III.1. DEFINITION DU TERRAIN (selon les aromathérapeutes)

DURAFFOURD définit ainsi le terrain (5 - 6) : "Le terrain est le résultat de l'équilibre qui s'instaure dans la physiologie de l'individu pour lui permettre de s'adapter à son environnement, avec le seul concours des facultés organiques qui lui sont propres et dont il dispose par son héritage génétique. Cette faculté d'adaptation repose essentiellement sur le système neuro-endocrinien et sur le système nerveux autonome qui peuvent être perturbés aussi par d'autres voies, par exemple par certains déficits enzymatiques congénitaux ou par certaines malformations organiques". En somme, le terrain représente l'ensemble vivant, structurel, initial par lequel l'être est en équilibre physiologique plus ou moins précaire. Le terrain, qui est donc le milieu physiologique propre à chacun est la préoccupation majeure de l'aromathérapeute.

On remarquera toutefois que cette définition du terrain est assez restreinte. En effet, elle ne fait pas apparaître le support immunologique du terrain classiquement admis actuellement en médecine traditionnelle.

III.2. LA NOTION DE MALADIE EN AROMATHERAPIE

La médecine aromathérapique considère la symptomatologie présentée par un malade comme la traduction d'un déséquilibre organique plus ou moins profond, contre ou pour lequel l'organisme lutte.

Il convient donc de déterminer ce déséquilibre si on veut aider l'organisme non seulement à se défendre, mais encore à reprendre son équilibre initial, par lequel seulement il sera capable de retarder toute nouvelle agression.

Dans tous les cas, la maladie représente la réponse à une agression ; les réponses seront différentes en fonction de l'intensité, de la répétition ou non de cette agression : par exemple, si cette dernière est forte et unique, on entre dans le cadre de la maladie aiguë.

En aromathérapie, dans un cas particulier, on peut relier le terrain aux maladies au niveau de l'action antiseptique : il s'agit de l'aromatogramme.

III.3. L'AROMATOGRAMME

1) Définition

L'aromatogramme est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (1)

2) Technique

Cet examen est équivalent à un antibiogramme dans lequel les antibiotiques sont remplacés par des essences aromatiques préalablement sélectionnées et reconnues.

L'examen peut être réalisé sur trois milieux :

- sur gélose (milieu solide), en utilisant la méthode des cupules ou la méthode des disques.
- en micro-atmosphère (milieu gazeux)
- sur bouillon (milieu liquide)

Actuellement, la méthode la plus utilisée est celle des disques, sur milieu solide. Cette technique permet de réaliser facilement ces tests dans la pratique quotidienne (tant sur le plan technique que sur le plan financier). Comme pour l'antibiogramme, autour de chaque disque imprégné d'une huile essentielle active sur le germe testé, se dessine une zone d'inhibition dépourvue de colonies, d'un diamètre proportionnel à l'activité des essences sur le germe.

3) Valeur de l'aromatogramme

Ce test permet de quantifier avec précision l'activité des huiles essentielles testées, mais ceci in vitro et non in vivo.

* Fiabilité

L'épreuve de fiabilité consiste à pratiquer plusieurs aromatogrammes en même temps sur le même germe et à montrer que les résultats obtenus sont identiques. Ceci est observé à condition :

- que les essences testées sur tous les aromatogrammes fassent partie du même lot (c'est-à-dire aient les mêmes caractéristiques chromatographiques)
- que la technique de laboratoire utilisée soit toujours la même.

* Reproductibilité

Il s'agit de la fiabilité dans le temps. Comme pour la fiabilité, la reproductibilité ne peut être établie avec certitude qu'à condition d'utiliser à chaque fois le même lot d'essence.

Malgré les difficultés d'exploitation, cette épreuve semble être une bonne méthode pour adapter la thérapeutique selon le germe en cause et selon les différences individuelles (le terrain).

4) L'indice aromatique (selon BELAICHE (1))

La pratique de l'aromatogramme en milieu solide permet de définir l'indice thérapeutique (ou indice aromatique) d'une huile essentielle : il s'agit du rapport entre le diamètre, exprimé en millimètres, du halo d'inhibition obtenu en milieu solide et celui d'une huile essentielle idéale et fictive dont l'action germicide serait maximale dans 100 p. cent des cas.

L'étude comparative des indices aromatiques des diverses essences permet leur classification en trois groupes :

Groupe n° 1 : Essences germicides majeures

Il comprend des essences dont l'action anti-bactérienne est forte et constante. L'indice aromatique se situe entre 0,45 et 1, aussi bien sur les gram + et les gram - que sur les champignons.

Ces essences sont :

- H.E. d'origan d'Espagne
- H.E. de sarriette
- H.E. de cannelle de Ceylan
- H.E. de thym
- H.E. de girofle

Groupe n° 2 : Essences germicides médiums

L'indice aromatique de ces huiles essentielles se situe approximativement au-dessous de 0,45, mais leur indice aromatique moyen est supérieur à 0,1.

Ce groupe comprend les essences suivantes :

- H.E. de pin (indice aromatique moyen : 0,347)
- H.E. de cajepout (0,333)
- H.E. d'eucalyptus (0,296)
- H.E. de lavande (0,296)
- H.E. de myrthe (0,250)

- H.E. de géranium rosat (0,187)
- H.E. d'estragon (0,140)
- H.E. de serpolet (0,126)
- H.E. de niaouli (0,100)

Groupe n° 3 : Essences dites de terrain

Il s'agit d'un groupe disparate, d'huiles essentielles qui présentent une action antiseptique seulement dans certains cas.

L'action antiseptique de ce groupe d'essences est relativement imprévisible.

III.4. METHODES EN AROMATHERAPIE

L'aromathérapie externe

Elle utilise les bains, les frictions, les massages. Ce sont des méthodes dites iatraliptiques* consistant à faire passer les huiles essentielles à travers la peau.

Les huiles essentielles associées à d'autres substances, facilitent d'ailleurs l'absorption de ces dernières (7).

L'aromathérapie interne

Bien qu'ayant été utilisée au début du siècle, l'aromathérapie par injection hypodermique est pratiquement abandonnée actuellement et l'on peut résumer l'aromathérapie interne en trois chapitres :

- * L'absorption par les voies respiratoires : il s'agit des fumigations, des inhalations, aérosols.
- * L'absorption par voie rectale : administration des huiles essentielles sous forme de lavements ou de suppositoires.
- * L'absorption par voie digestive : selon les cas, les huiles essentielles sont employées en solution alcoolique ou huileuse, en émulsion dans l'eau, en perles ou en capsules.

L'élimination des huiles essentielles se fait essentiellement par voie rénale, mais une petite partie également est éliminée par voie respiratoire.

*iatraliptique : méthode thérapeutique qui consiste à faire pénétrer les médicaments à travers la peau recouverte de son épiderme.

Les huiles essentielles forment donc une gamme très étendue de composés chimiques, de fonctions extrêmement diverses et d'action variée sur l'organisme.

La médecine aromathérapique utilise ces huiles essentielles comme bases de la thérapeutique. Celle-ci a pour but de corriger les déséquilibres physiologiques de chaque individu malade, et donc de restaurer "le terrain".

On remarquera toutefois, que les concepts en aromathérapie sont assez imprécis. En particulier, le mode d'action des huiles essentielles n'est pas explicite à l'heure actuelle.

DEUXIEME PARTIE:

DONNEES EXPERIMENTALES.

DONNÉES EXPÉRIMENTALES

A. ANALYSE DE LA SPÉCIALITÉ AROMATHÉRAPIQUE

Cette analyse a été réalisée au laboratoire de Pharmacie-Toxicologie de l'ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON.

I. DESCRIPTION ET FORMULE INTÉGRALE DE LA SPÉCIALITÉ

I.1. CARACTÈRES

- Liquide incolore à jaune pâle, limpide.
- Odeur d'essences à prédominance de menthe.

I.2. COMPOSITION

Essence de menthe	1,50 g
Essence de girofle	0,50 g
Essence de thym	0,50 g
Essence de cannelle	0,50 g
Essence de lavande	0,50 g
Excipient : alcool q.s.p.....	100 g

I.3. ORIGINE ET PROPRIÉTÉS DES ESSENCES

Nous constatons la présence de trois essences dites majeures, c'est-à-dire d'essences dont l'action germicide est forte et constante :

l'essence de girofle, l'essence de thym et l'essence de cannelle.

Leurs indices aromatiques se situent entre 0,45 et 1 (cf. III.3.)

* L'essence de THYM (Thymus vulgaris, Labiée)

L'huile essentielle de thym est retirée des sommités fleuries par distillation à la vapeur et est ensuite rectifiée pour en éliminer les substances irritantes.

Elle est réputée pour son action : eupnéique, cholérétique, antispasmodique (anti-tussif) (4), anthelminthique, antiseptique intestinal et pulmonaire.

Parmi les spécialités à base de thym, plus de 50 p. cent sont des spécialités à usage externe (O.R.L. en particulier).

* L'essence de GIROFLE (*Eugenia caryophyllata*. Myrtacée)

L'essence est retirée des boutons floraux, séchés à l'air, par distillation à la vapeur.

A part cette spécialité, on ne retrouve pratiquement aucune spécialité qui en contienne (elle entrerait cependant dans la composition du Laudanum de Sydenham : 1 gramme par litre).

Elle est essentiellement utilisée pour ses propriétés antiseptiques au niveau de la cavité buccale.

* L'essence de CANNELLE (*Cinnamomum zeylanicum* - Lauracée)

L'essence est obtenue par distillation à la vapeur d'eau de l'écorce et des feuilles. Nous retiendrons surtout ses propriétés stimulantes et astringentes. L'essence de cannelle est notamment utilisée en cas d'asthénie grippale.

A côté de ces essences majeures, les essences de menthe et de lavande sont dites "médiums" : leur indice aromatique se situe approximativement au-dessous de 0,45 mais il est en moyenne supérieur à 0,1.

* L'essence de LAVANDE (*Lavandula officinalis* - Labiée)

L'huile essentielle est obtenue par distillation de la plante à la vapeur. Hormis son activité sédative, l'essence de lavande est un antiseptique pulmonaire et un modificateur des sécrétions bronchiques. Elle est donc particulièrement indiquée dans le cas des affections des voies respiratoires.

* L'essence de MENTHE (*Mentha piperita* - Labiée)

L'essence est obtenue par distillation à la vapeur des feuilles et des sommités fleuries.

C'est un bon antiseptique général et un expectorant.

II. CONTRÔLE ANALYTIQUE DU PRODUIT FINI

II.1. ESSAIS

1) Densité

A 20° C, elle doit être comprise entre 0,810 et 0,880.

2) Titre alcoolique

La teneur en éthanol doit être comprise entre 90 et 95 p. cent.

3) Extrait sec

Le résidu sec doit être inférieur ou égal à 2 p. cent.

Identification

Les huiles essentielles étant des composés très volatils, l'identification des principaux constituants entrant dans la composition de la spécialité est réalisée lors de leur dosage par chromatographie en phase gazeuse. Ces différents constituants sont identifiés par leur temps de rétention.

II.2. DOSAGE DES PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA SPECIALITE

1) Solution étalon pour l'identification des constituants

Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire environ, exactement pesés, 500 mg des constituants suivants :

Pinène α
Pinène β
Para cimène
Menthone
Linalol
Acétate de Linalyle
 β caryophyllène
Menthol
Aldéhyde cinnamique
Eugénol
Thymol
Carvacrol

Ajuster au trait de jauge avec de l'alcool éthylique à 95°.

2) Solution essai

La solution essai est constituée par la spécialité.

3) Conditions chromatographiques

Appareil	chromatographe en phase gazeuse PACKARD BECKER type 417 ou similaire (avec programmation de température)
Détecteur	ionisation de flamme avec buse de quartz
Colonne	verre - longueur 2 mètres - diamètre intérieur 3 mm
Support	chromosorb W/AW-DMCS
Phase	Carbowax 20 M (10 p. cent) Acide p. phtalique (2 p. cent)
Températures	injecteur : 250° C four : de 80 à 230° C à raison de 4° C/minute détecteur : 280° C
Débits	gaz vecteur azote HP : 40 ml/minute hydrogène HP : 35 ml/minute air : 300 ml/minute
Intégrateur	HEWLETT PACKARD type 3370 B ou similaire
Enregistreur	KIPP et ZOONEN type 307 ou similaire vitesse de défilement 5 mm/minute

4) Mode opératoire

Dans les conditions chromatographiques décrites en II.2.3), injecter 10 ml de la solution essai, puis 10 ml de la solution étalon.

Sur le chromatogramme étalon et le chromatogramme essai, identifier chaque pic par son temps de rétention.

Temps de rétention (approximatif)

(exprimé en minutes et 1/100 ème de minute)

Pinène α	1,1
Pinène β	2,5
Para cymène	5

Menthone	9,6
Linalol	11,8
Acétate de Linalyle	12,5
β Caryophyllène	13,6
Menthol	14,5
Aldéhyde cinnamique	24,4
Eugénol	27,5
Thymol	30,4
Carvacrol	31,2

Sur le chromatogramme essai, déterminer la surface de chaque pic par rapport à la surface totale (méthode d'analyse quantitative par normalisation interne).

Les limites d'acceptation pour chaque constituant sont les suivantes :

Pinène $\alpha + \beta$	3 à 6 p. cent
Para cymène	7 à 11 p. cent
Menthone	6 à 14 p. cent
Linalol	4 à 7 p. cent
Acétate de Linalyle	5 à 8 p. cent
β caryophyllène	2 à 5 p. cent
Menthol	au minimum 18 p. cent
Aldéhyde cinnamique	9 à 13 p. cent
Eugénol	au minimum 12 p. cent
Thymol	) au minimum 4 p. cent
Carvacrol	

III. RÉSULTATS D'EXAMENS, CRITIQUES DES MÉTHODES PROPOSÉES

III.1. RESULTATS

L'examen des limites extrêmes d'acceptation n'a porté que sur le médicament terminé. En effet, toutes les matières premières figurent à la Pharmacopée Française.

(conférer tableau ci-après).

Détermination	Limites d'acceptation	Résultats
<u>CARACTERES</u>		
aspect	liquide limpide, incolore à jaune clair	conforme
odeur	odeur d'essences végétales à prédominance de menthe	conforme
volume extractible	≥ 86 ml	conforme
<u>ESSAIS</u>		
densité à 20° C	0,810 à 0,880	0,815
titre alcoolique	90 à 95 p. cent	92,2 p. cent
extrait sec	≤ 2 p. cent	conforme
identification	temps de rétention (en mn) (approximatif)	
pinène α	1,1	1,1
pinène β	2,5	2,5
para cymène	5	5,0
menthone		
linalol	11,8	11,8
acétate de linalyle	12,5	12,5
β caryophyllène	13,6	13,6
menthol	14,5	14,5
aldéhyde cinnamique	24,4	24,4
eugénol	27,5	27,5
thymol	30,4	30,4
carvacrol	31,2	31,2

TENEURS		
pinène $\alpha + \beta$	3 à 6 p. cent	5,5 p. cent
para cymène	7 à 11 p. cent	8,7
menthone	6 à 14 p. cent	12,8
linalol	4 à 7 p. cent	5,9
acétate de linalyle	5 à 8 p. cent	7,3
β caryophyllène	2 à 5 p. cent	3,2
menthol	au minimum 18 p. cent	22,4
aldéhyde cinnamique	9 à 13 p. cent	11,8
eugénol	au minimum 12 p. cent	17,1
thymol	au minimum 4 p. cent	4,1
carvacrol		1,2

L'échantillon analysé est donc conforme aux spécifications annoncées.

III.2. VALEURS DES METHODES PROPOSEES

1) L'identification des principes actifs est basée sur l'identification des principaux constituants des essences végétales entrant dans la composition de la spécialité.

Cette identification est réalisée par chromatographie en phase gazeuse, en comparant les temps de rétention des pics obtenus en analysant la préparation par rapport à ceux obtenus avec un mélange de substances étalons.

2) Le dosage des principes actifs est réalisé par chromatographie en phase gazeuse en déterminant, selon la méthode de normalisation interne, le pourcentage des principaux constituants des essences végétales entrant dans la composition de la spécialité.

Pour contrôler le choix de ces différents constituants, nous avons analysé chaque essence par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions décrites pour l'analyse du produit fini.

Pour chaque essence, nous décrivons ci-dessous la composition et fournissons le chromatogramme obtenu (le volume injecté est de 0,2 ml). (cf. annexe n° 1).

* Essence de MENTHE

Constituants	Teneur (p. cent)	Temps de rétention (en mn)
Pinène α	0,82	1,7
Pinène β	1,4	2,5
Non identifié	6,6	4
Menthone	28,3	9,7
Acétate de menthyl	5,8	12,4
Non identifié	2,8	13,1
Menthol	51	14,3
Non identifié	2,6	16,5

* Essence de LAVANDE

Constituants	Teneur (p. cent)	Temps de rétention (en mn)
Limonène	7,2	4,4
Para Cymène	2,9	4,5
Linalol	39,9	11,6
Acétate de Linalyle	45,2	12,2
β Caryophyllène	4,8	13,5

* Essence de GIROFLE

Constituants	Teneur (p. cent)	Temps de rétention (en mn)
β Caryophyllène	10,8	13,6
α Caryophyllène	1	15,5
Eugénol	83,4	27,6
Non identifié	1,6	29,7

* Essence de CANNELLE

Constituants	Teneur (p. cent)	Temps de rétention (en mn)
Pinène α	1,6	1,7
Pinène β	2,1	2,7
Non identifié	2,1	4
Linalol	3,7	11,5
Aldéhyde cinnamique	81,9	24,5
Eugénoï	14,6	27,5

* Essence de THYM

Constituants	Teneur (p. cent)	Temps de rétention (en mn)
Para Cymène	53	5,3
Eugénoï	1,9	27,9
Thymol	24,4	30,4
Carvacrol	19,5	34,4

Cette étude permet de dégager les principaux constituants susceptibles d'être retrouvés dans la spécialité.

Nous regroupons dans le tableau ci-après, les diverses essences et leurs constituants majeurs.

Essences	Constituants majeurs	
	Nature	Teneur (p. cent)
Menthe	Menthone	28,3
	Menthol	51
Lavande	Linalol	39,9
	Acétate de Linalyle	45,2
Girofle	Eugénol	85,4
	β Caryophyllène	10,8
Cannelle	Aldéhyde cinnamique	81,9
	Eugénol	14,6
Thym	Para Cymène	53
	Thymol	24,4
	Carvacrol	19,5

Cette étude nous permet de conclure que le choix des principaux constituants pour identifier les essences végétales entrant dans la composition de la spécialité est nécessaire et suffisant.

L'identification des Pinènes α et β présents dans les essences de menthe et de cannelle vient compléter ce test.

D'autre part, l'analyse quantitative est basée sur la méthode de la normalisation interne. Cependant, dans le cas présent, il n'est pas tenu compte du facteur de réponse de chaque constituant. Cette simplification de la méthode de la normalisation interne est rendue nécessaire. En effet, la détermination du facteur de réponse de 13 constituants pour chaque analyse de routine alourdirait considérablement les analyses. Nous avons vérifié que la méthode préconisée permet une reproductibilité compatible avec le contrôle pharmaceutique de la spécialité. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-après.

Constituants	Teneurs (p. cent)					Moyenne p. cent	Ecart type	Coef. de varia- tion de la moyenne
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5			
Pinène α	2,7	2,8	2,7	3,4	2,9	2,9	0,3	2,0
Pinène β	0,8	0,8	0,8	0,7	0,5	0,8	0,1	1,1
Para-Cymène	8,7	8,6	8,5	8,7	8,7	8,6	0,1	0,3
Menthone	11,4	11,7	11,4	11,5	12,8	11,8	0,6	1,0
Linalol	5,4	5,5	5,5	5,5	5,9	5,6	0,2	0,7
Acétate de linalyle	7,3	7,1	7,6	7,2	7,3	7,3	0,2	0,5
β caryo- phyllène	2,7	2,9	2,9	3,0	3,2	2,9	0,2	1,2
Menthol	23,0	23,0	22,9	22,6	22,4	22,8	0,3	0,2
Aldéhyde cinnamique	12,2	11,4	12,1	11,9	11,8	11,9	0,3	0,5
Eugénol	16,4	16,8	16,4	16,5	17,1	16,6	0,3	0,4
Thymol	3,8	4,0	3,9	3,8	4,1	3,9	0,1	0,7
Carvacrol	1,0	1,1	1,0	1,0	1,2	1,1	0,1	1,7

Cette étude nous a donc permis de déterminer les différents constituants entrant dans la composition de la spécialité d'une part, et de vérifier que cette préparation aromathérapique est conforme aux spécifications annoncées d'autre part.

B. EFFET DE LA PRÉPARATION SUR LA SENSIBILITÉ DE LA SOURIS À UNE INFECTION GRIPPALE EXPÉRIMENTALE

Cette étude s'est déroulée en deux temps : nous avons d'abord travaillé sur de nombreux lots comportant un nombre restreint d'animaux, en utilisant diverses solutions de virus et des concentrations différentes de substances à tester ; dans un deuxième temps, nous avons réalisé une épreuve de confirmation, sur un plus grand nombre d'animaux, en étudiant les cas où un éventuel effet protecteur a pu être observé dans la première phase.

PREMIÈRE PHASE : RECHERCHE D'UN ÉVENTUEL EFFET PROTECTEUR

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. LES ANIMAUX

1) Choix de l'espèce animale

Nous avons recherché un modèle expérimental répondant aux caractères suivants : - être de type mammifère,

- présenter des facilités d'élevage et de manipulation,
- offrir la possibilité de réaliser des lots suffisamment importants.

La souris présentant tous ces caractères, nous avons choisi ce modèle.

2) Espèce, Race ou Souche

Souris SWISS IOPS OF 1 mâles et femelles en bonne condition physique.

3) Poids en début d'essai

18-20 grammes.

4) Origine

IFFA Credo - Centre d'Élevage d'Animaux de Laboratoire des Oncins - 69210 L'ARBRESLE.

5) Période d'observation avant l'essai

Trois jours.

6) Maintenance des animaux

a. Animalerie

- Température : $22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$
- Hygrométrie : 55 ± 5 p. cent
- Renouvellement d'air : 12 renouvellements d'air par heure

b. Aliment

Croquettes U A R, Rats, Souris - Entretien
Ad libitum.

c. Boisson

Eau de la Ville de Lyon, additionnée ou non de la préparation.
Ad libitum.

d. Litière

Sciure de bois S.D. - Autoclavée.

e. Cages

Cages en propylène.

I.1. L'INFECTION VIRALE

1) Choix de l'infection virale

Le modèle utilisé devait présenter les caractères suivants :

- être applicable à l'espèce de laboratoire choisie : la souris.
- être facile à manipuler et à entretenir.
- être facile à caractériser.
- avoir un pouvoir pathogène parfaitement défini et reproductible.
- provoquer une infection respiratoire puisque la préparation est recommandée dans ce genre d'infection.

Nous avons donc choisi un Myxovirus Influenza de type A, souche A/Equi/Prague 56, de l'O.M.S., agent d'une grippe équine et adapté à la souris par passage en série sur souris.

Outre les caractères exposés ci-dessus, l'utilisation de ce virus présente les avantages suivants :

- ce virus est bien connu, ayant donné lieu à de nombreux travaux, tant au niveau de sa structure, qu'à celui de la cinétique de l'infection et de la réponse immune.

- son pouvoir pathogène est bien défini : l'infection virale est létale pour la souris de 18-20 g en 4 à 7 jours et on peut définir la DL 50 (dose létale 50 %).
- Le degré d'infection peut être quantifié assez facilement :
 - . on peut l'évaluer par le pourcentage de mortalité et par le temps s'écoulant entre l'inoculation et la mort.
 - . chez les survivantes, on tient compte de la perte de poids, due à la déshydratation par état fébrile.

2) Description de l'infection virale

a. Origine

Le virus a été fourni par Madame FONTAINE, du laboratoire de Pathologie Médicale de l'ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE LYON.

b. Obtention de la suspension-mère de virus

La suspension virulente a été préparée à partir d'un stock de virus dont on a réalisé le 25ème passage sur un lot de 10 souris de 18-20 g.

On a pratiqué l'inoculation intra-nasale à des souris que l'on a sacrifiées 72 heures après, avant l'apparition des symptômes.

La suspension-mère de virus est obtenue en broyant les poumons des souris dans un tampon phosphate (P B S), à raison de deux poumons dans 1 ml de P B S.

c. Réalisation des différentes dilutions de la solution-mère

- Trois dilutions sont préparées à partir de la solution-mère :

dilutions de $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{1000}$

Méthode : à 1 ml de solution-mère on ajoute 9 ml de solution tampon phosphate pour obtenir la dilution $\frac{1}{10}$, à partir de laquelle

on obtiendra la dilution $\frac{1}{100}$, etc...

Le choix des dilutions a été effectué sur les bases moyennes suivantes :

- . dilutions $\frac{1}{10}$: apparition des symptômes dès 48 heures
mortalité totale à la fin de l'expérimentation

- . dilution $\frac{1}{100}$: apparition des symptômes le 4ème jour.
mortalité de 80 p. cent à la fin de l'expérimentation.
- . dilution $\frac{1}{1000}$: apparition des symptômes le 6ème jour.
mortalité de 40 à 50 p. cent à la fin de l'expérimentation.

I.3. METHODOLOGIE

1) Essais préliminaires de distribution de la spécialité

Il est recommandé d'administrer la préparation aromatique par voie orale

Modalités éventuelles d'administration per os :

- intubation quotidienne des souris
- distribution du produit dans l'eau de boisson
- mélange du produit aux aliments

a. Mélange du produit aux aliments

Cette solution ne peut être réalisée compte tenu du caractère volatil de la préparation.

D'autre part, il serait difficile de quantifier la dose de produit absorbée par chaque animal.

Cette solution est donc à rejeter.

b. Intubation quotidienne des souris

Dans un essai préparatoire, nous avons constitué 3 lots de 9 souris :

Lot A = Témoins

Lot B = recevant en intubation une solution de la spécialité diluée dans de l'eau.

Lot C = recevant en intubation une solution d'alcool et d'eau, l'alcool étant à la même concentration que la spécialité reçue par le lot B.

L'intubation a lieu quotidiennement, à heure fixe. En même temps on réalise une pesée de chaque lot.

* Résultats : Lot A : gain de poids de 3,3 g par souris en moyenne en 4 jours.

Lot B : gain de poids de 0,3 g par souris en moyenne en 4 jours.

Lot C : gain de poids de 0,35 g par souris en moyenne en 4 jours.

* Discussion : - cette voie d'administration est facile à mettre en oeuvre.

- on observe une nette différence de gain de poids entre les animaux intubés et les animaux témoins.

Celle-ci ne peut être attribuée à la préparation elle-même puisque le gain de poids des animaux est identique dans les lots B et C.

La différence de gain de poids doit être attribuée au stress dû à la manipulation des animaux lors de l'intubation.

Or, cette manipulation est indispensable pour réaliser l'intubation des souris. Nous ne pouvions donc pas retenir cette modalité d'administration de la préparation.

c. Distribution du produit dans l'eau de boisson

Dans un essai préparatoire, nous avons constitué 2 lots de 9 souris :

Lot A = Témoins

Lot B = recevant la préparation dans l'eau de boisson.

Nous avons relevé quotidiennement la quantité d'eau ingérée en moyenne par chaque souris, pendant 10 jours.

* Résultats : - consommation du lot A = 6 ml/souris/24 heures

- consommation du lot B = 5,2 ml/souris/24 heures

* Discussion : à priori, il semblait donc possible d'utiliser cette voie d'administration, la différence de consommation entre les lots A et B restant acceptable.

Cependant, nous devons déterminer la concentration de la préparation aromatique dans la solution distribuée et vérifier que le produit lui-même était bien ingéré par les souris.

Réalisation de la solution distribuée aux souris

- . Posologie recommandée pour un homme adulte de 70 kg environ : 5 ml de substance par jour.
- . Dose moyenne qui devra être ingérée quotidiennement par une souris : 0,01 ml.
- . Boisson consommée en moyenne par jour et par souris : 5,2 ml.

On en déduit donc la concentration en préparation de la solution distribuée en eau de boisson aux souris :

1 ml de la spécialité pour 499 ml d'eau de consommation.

Contrôle de l'ingestion du produit par les souris

Les constituants de la préparation aromatique présentent un caractère alcoolique et lipophile et sont donc peu miscibles à l'eau.

Nous avons réalisé un spectre étalon (en U.V.) d'une solution contenant 1 ml de la spécialité pour 499 ml d'eau. Le spectre a été enregistré immédiatement après la confection de la solution, celle-ci ayant été agitée.

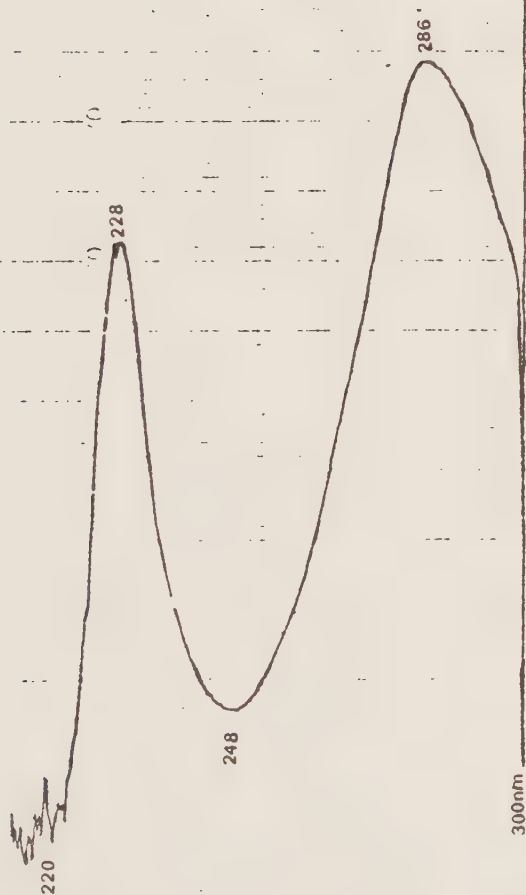
Nous obtenons un spectre caractéristique (cf. spectre n° 1).

Toutes les deux heures, nous avons enregistré le spectre de la solution ingérée par les souris : nous avons laissé le biberon contenant la solution parfaitement immobile et nous avons prélevé exactement au fond du biberon, ce qui correspond à la partie absorbée par les souris.

Nous obtenons des spectres identiques à la solution-mère durant 24 heures (cf. spectres n° 2 et n° 3).

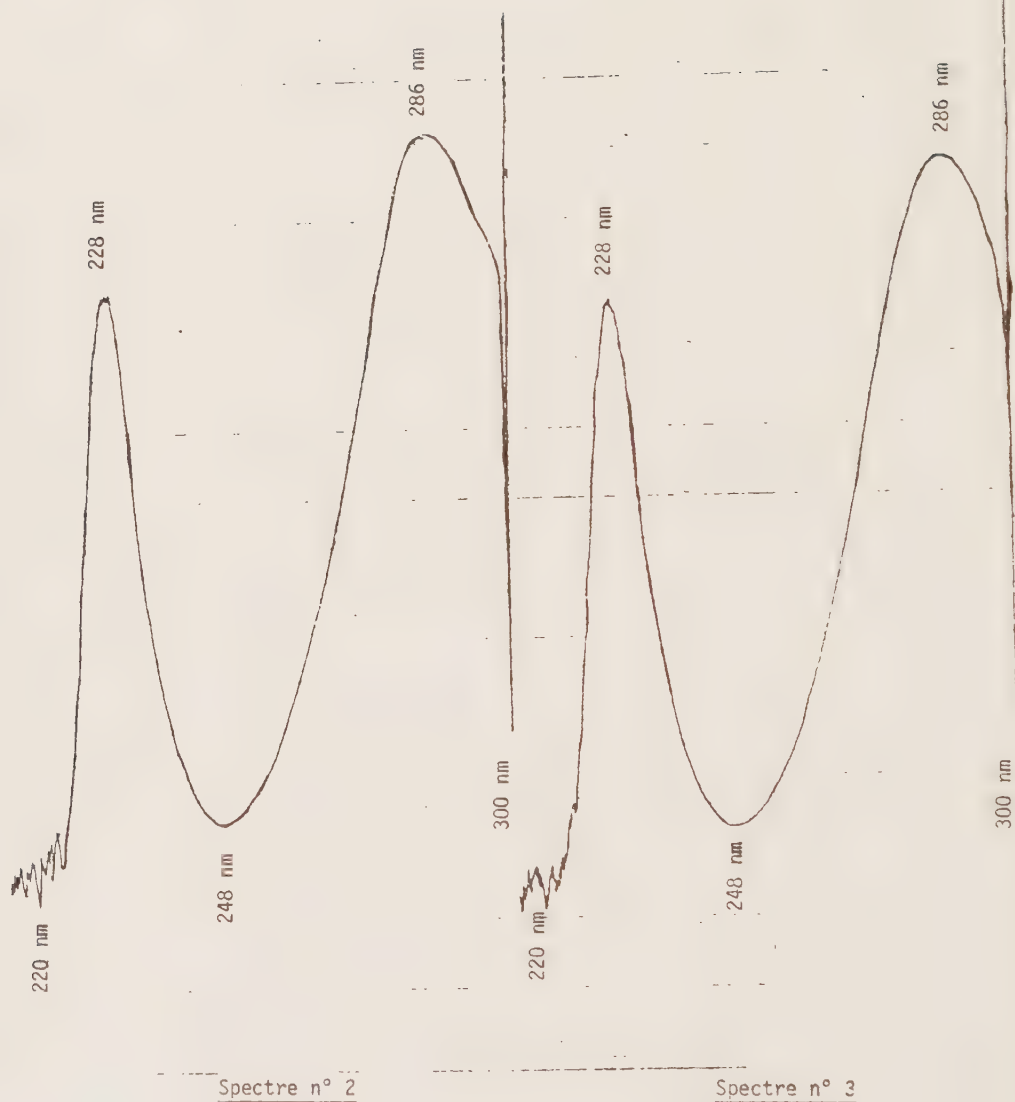
Nous pouvons donc affirmer que les souris recevaient la quantité de substance escomptée.

En résumé, cette dernière modalité - distribution de la spécialité aromatique dans l'eau de boisson - est parfaitement acceptable, elle a donc été adoptée pour l'ensemble des essais.



Spectre n° 1 :

Spectre étalon d'une solution contenant 1 ml de la spécialité pour 499 ml d'eau.



Spectres obtenus 12 heures et 24 heures après
la confection de la solution

2) Modalité finale de distribution de la spécialité

Une solution "neuve" de substance est confectionnée chaque matin. Cette solution est distribuée aux souris dans des biberons parfaitement rincés au préalable.

Les biberons sont agités matin et soir.

3) Réalisation des différents lots

La spécialité est distribuée : d'une part,

- en traitement préventif, durant les 10 jours précédant l'inoculation du virus.
- en traitement curatif durant les 14 jours suivant l'inoculation du virus.

d'autre part,

- à dose simple : 1 ml de substance dans 499 ml d'eau.
- à dose double : 2 ml de substance dans 498 ml d'eau.

Ce traitement à dose double a pour but de constater l'influence ou non de la dose sur la réponse à l'infection grippale.

Nous avons donc réalisé les lots suivants (de 10 souris en moyenne) :

A. Lots recevant la spécialité en traitement préventif à dose simple

1. dilution du virus $\frac{1}{10}$
2. dilution du virus $\frac{1}{100}$
3. dilution du virus $\frac{1}{1000}$

B. Lots recevant la spécialité en traitement préventif à dose double

dilution du virus : idem

C. Lots recevant la spécialité en traitement curatif à dose simple

dilution du virus : idem

D. Lots recevant la spécialité en traitement curatif à dose double

dilution du virus : idem

E - lots témoins ; 1 lot témoin par dilution de virus. Animaux inoculés, non traités

F - lot témoin : animaux non inoculés et non traités

4) Inoculation du virus

a. Voie d'inoculation

Voie intranasale, qui est la voie naturelle de l'infection grippale.

b. Modalité d'inoculation

L'inoculation se réalise en une seule fois.

On place sur chaque narine de la souris, solidement tenue en main, une goutte de la dilution choisie.

Au préalable, on réalise une légère anesthésie à l'éther pour éviter que l'animal ne déglutisse la goutte et pour faire en sorte qu'il l'inspire réellement.

5) Période d'observation

Fixée à 14 jours après l'inoculation.

Durant cette période, on réalise :

- un examen clinique et comportemental des animaux matin et soir,
- un relevé de la mortalité matin et soir,
- une pesée des différents lots le jour de l'inoculation, et une pesée les 7ème et 14ème jours si le nombre d'animaux encore vivants est suffisamment important,
- l'autopsie d'un certain nombre d'animaux, celle-ci étant orientée sur la cavité thoracique.

I.4. ETUDE STATISTIQUE

Pour chaque essai, nous comparerons les pourcentages de mortalité entre les animaux Témoins et les animaux traités

1) Méthode utilisée

Méthode pour la comparaison de deux proportions, c'est-à-dire la méthode de χ^2 , corrigée pour la continuité (correction de Yates, obligatoire dans le cas d'un tableau 2 x 2).

Dans notre cas ; degré de liberté = 1

Significatif au seuil de 5 p. cent.

II. RÉSULTATS

Résultats obtenus en utilisant successivement la spécialité aromathérapique en

- traitement préventif à dose simple
- traitement préventif à dose double
- traitement curatif à dose simple
- traitement curatif à dose double

Dans chaque cas, nous noterons les résultats obtenus aux dilutions de virus

$$\frac{1}{10}, \frac{1}{100}, \frac{1}{1000}$$

II.1. TRAITEMENT PREVENTIF A DOSE SIMPLE

1) Dilution $\frac{1}{10}$ du virus

a. Examen clinique

■ Symptômes

Les premiers symptômes apparaissent dès 48 heures : le poil devient piqué ; on note une nette frilosité des animaux ; les souris tendent à se blottir les unes contre les autres dans un coin de leur cage.

Les signes cliniques s'aggravent les jours suivants : le poil est terne et hirsute ; les yeux sont collés et gonflés, les narines croûteuses

On note une très nette diminution de l'activité, une anorexie, une polypnée puis une dyspnée.

Les souris se déshydratent : dès le 3ème jour, le pli de la peau est persistant. Cette déshydratation entraîne une perte de poids. Les souris deviennent de plus en plus prostrées et meurent à partir du 5ème jour suivant l'inoculation.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 5ème jour pour les animaux témoins, le 6ème jour pour les animaux traités.

Les dernières morts sont enregistrées le 8ème jour pour les animaux témoins, le 13ème jour pour les animaux traités.

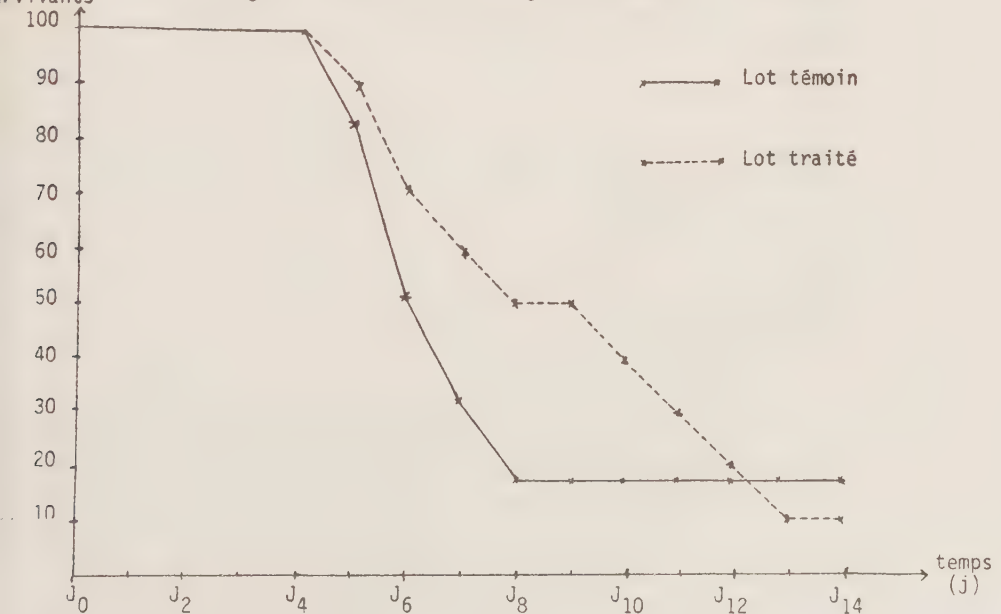
Dilution $\frac{1}{10}$	Nombre d'animaux	J ₄	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin non traité	6	100	83	50	33	17	17	17	17	17	17	17
Lot traité préventivement	10	100	90	70	60	50	50	40	30	20	10	10

Tableau n° 1 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement préventif à dose simple.

urcentage de
r vivants

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



b. Examen pondéral

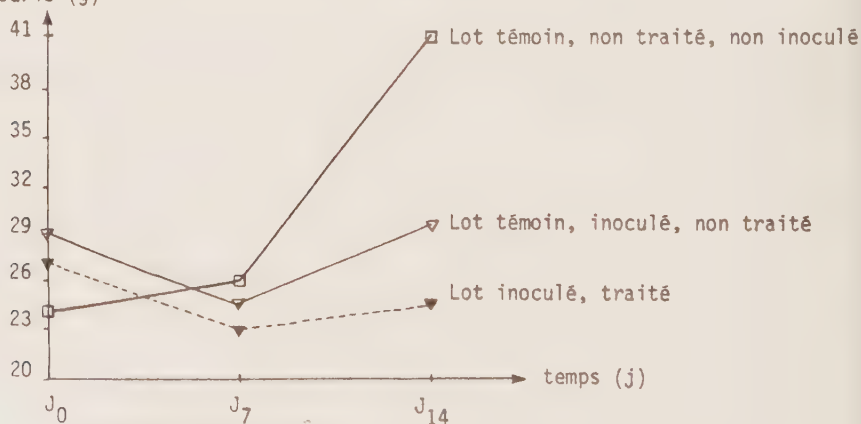
Dilution $\frac{1}{10}$	Poids moyen à J_0 par souris	Poids moyen à J_7 par souris (nombre de souris)	Poids moyen à J_{14} par souris (nombre de souris)
Animaux témoins, non inoculés et non traités	24	26 (6)	41 (6)
Animaux témoins, inoculés et non traités	29	24,5 (2)	29,5 (1)
Animaux inoculés et traités	27	23 (6)	24,5 (1)

Tableau n° 2 - poids moyen des souris à J_0 , J_7 et J_{14} (en g)

Traitement préventif à dose simple.

Poids moyen
d'une souris (g)

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



c. Résultat d'autopsie

On note uniquement une modification au niveau des poumons.

L'examen macroscopique des poumons montre des foyers d'induration, des foyers congestionnés de couleur brun-violet. Ces foyers sont toujours assez nombreux et tendent à envahir les poumons.

2) Dilution $\frac{1}{100}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Ils sont identiques aux symptômes décrits précédemment, mais ils n'apparaissent qu'à partir du 4ème jour.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 7ème jour pour les animaux traités, le 8ème jour pour les animaux témoins.

Les dernières morts sont enregistrées le 12ème jour pour les animaux témoins, le 14ème jour pour les animaux traités.

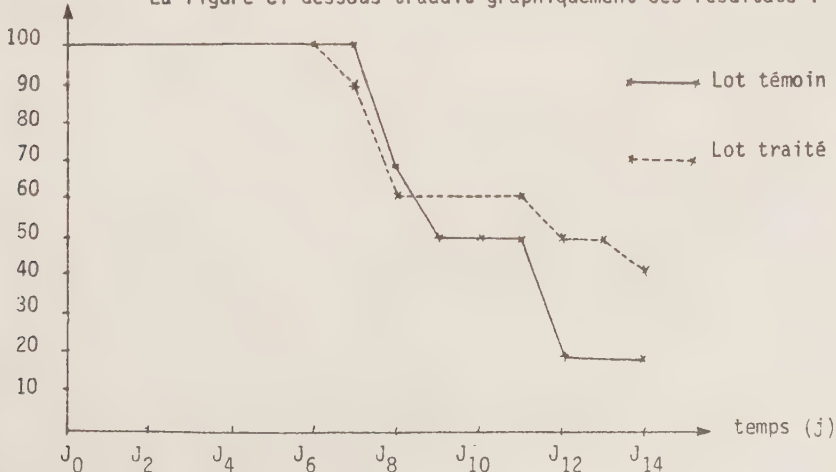
Dilution $\frac{1}{100}$	Nombre d'animaux	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin non traité	6	100	100	67	50	50	50	17	17	17
Lot traité préventivement	10	100	90	60	60	60	60	50	50	40

Tableau n° 3 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement préventif à dose simple.

pourcentage de survivants

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



b. Examen pondéral

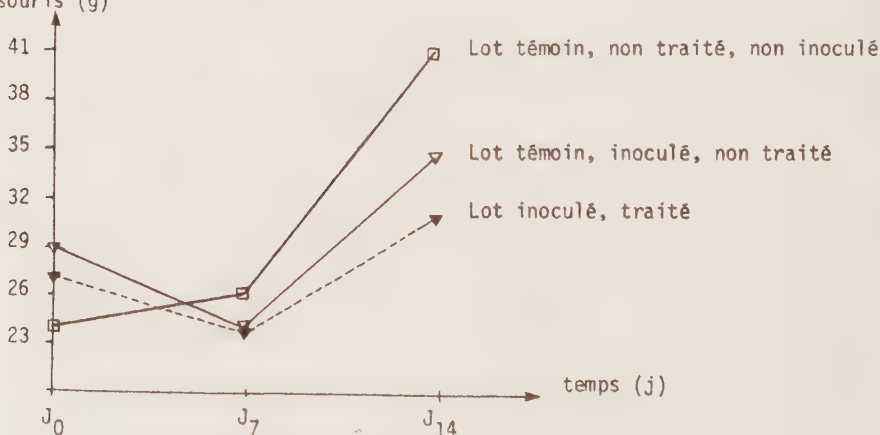
Dilution $\frac{1}{100}$	Poids moyen à J_0 par souris (g)	Poids moyen à J_7 par souris (g) (nombre de souris)	Poids moyen à J_{14} par souris (g) (nombre de souris)
Animaux témoins, non inoculés et non traités	24	26 (6)	41 (6)
Animaux témoins inoculés, non traités	29	24 (6)	34 (1)
Animaux inoculés et traités	27	23,5 (9)	30 (4)

Tableau n° 4 - poids moyen des souris à J_0 , J_7 et J_{14} (en g)

Traitement préventif à dose simple.

Poids moyen
d'une souris (g)

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



c. Résultat d'autopsie

Quelle que soit la dilution utilisée, les lésions observées au niveau des poumons sont identiques.

3) Dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques aux symptômes décrits précédemment, mais ils n'apparaissent qu'au 6ème jour.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 11ème jour pour les animaux témoins comme pour les animaux traités.

Les dernières morts sont enregistrées le 12ème jour pour les animaux traités.

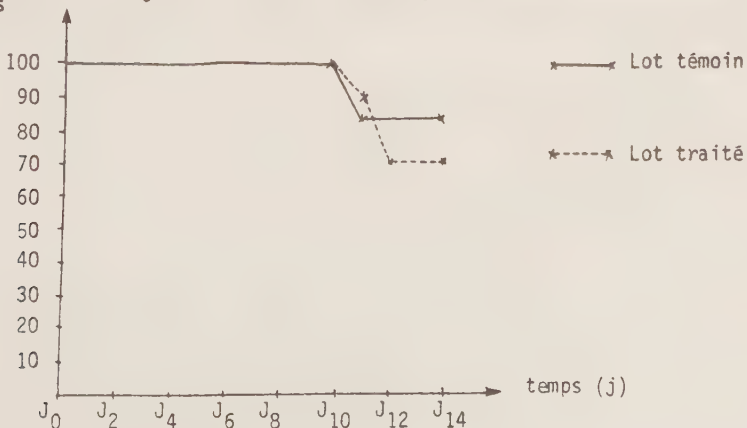
Dilution $\frac{1}{1000}$	Nombre d'animaux	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin non traité	6	100	83	83	83	83
Lot traité préventivement	10	100	90	70	70	70

Tableau n° 5 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement préventif à dose simple.

Pourcentage de survivants

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats.



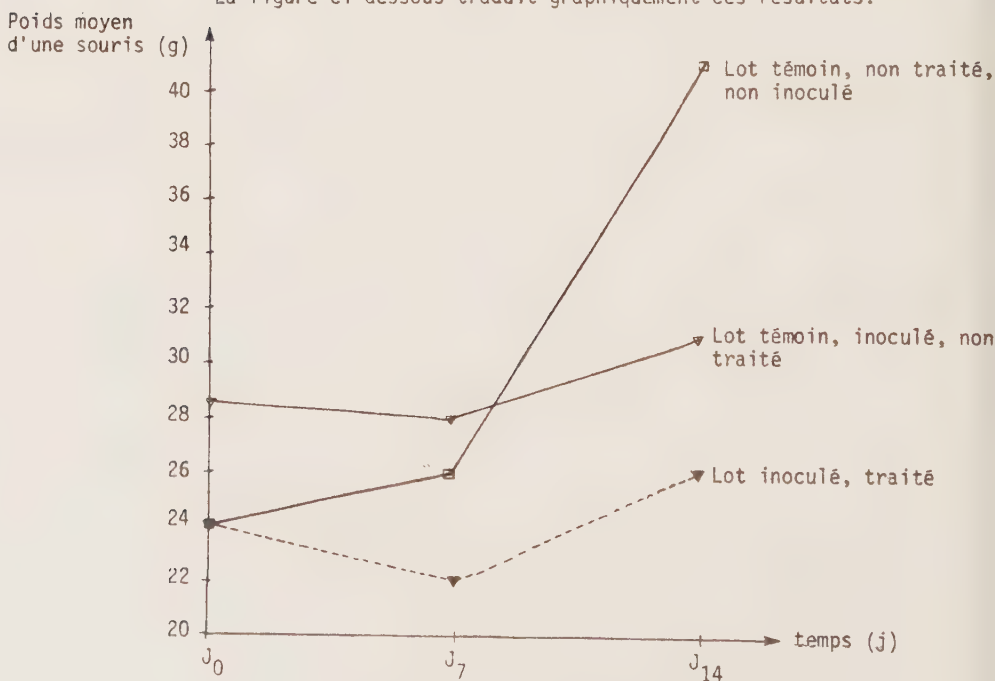
b. Examen pondéral

Dilution $\frac{1}{1000}$	Poids moyen à J_0 par souris (g)	Poids moyen à J_7 par souris (g) (nombre de souris)	Poids moyen à J_{14} par souris (g) (nombre de souris)
Animaux témoins, non inoculés et non traités	24	26 (6)	41 (6)
Animaux témoins, inoculés, non traités	28,5	28 (6)	31 (5)
Animaux inoculés et traités	24	22 (10)	26 (7)

Tableau n° 6 - poids moyen des souris à J_0 , J_7 et J_{14} (en g)

Traitement préventif à dose simple.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats.



II.2. TRAITEMENT PREVENTIF A DOSE DOUBLE

~~1^{re}~~ Dilution $\frac{1}{10}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques aux symptômes observés à la dilution $\frac{1}{10}$ avec le traitement préventif à dose simple.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 5^{ème} jour pour les animaux témoins comme pour les animaux traités.

Les dernières morts sont enregistrées le 8^{ème} jour pour les animaux témoins, le 12^{ème} jour pour les animaux traités.

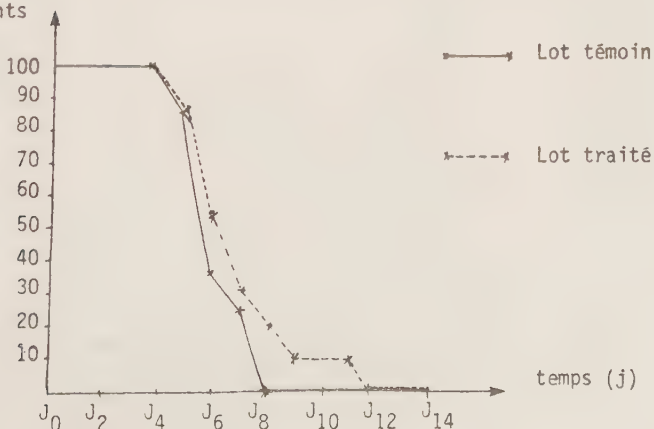
Dilution $\frac{1}{10}$	Nombre d'animaux	J ₄	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin non traité	3	100	87	37	25	0	0	0	0	0	0	0
Lot traité préventivement	9	100	89	56	33	22	11	11	11	0	0	0

Tableau n° 7 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement préventif à dose double.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :

Pourcentage de survivants



2) Dilution $\frac{1}{100}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques aux symptômes décrits à la dilution $\frac{1}{100}$ avec le traitement préventif à dose simple.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 7^{ème} jour pour les animaux témoins, le 6^{ème} jour pour les animaux traités.

Les dernières morts sont enregistrées le 10^{ème} jour pour les animaux témoins comme pour les animaux traités.

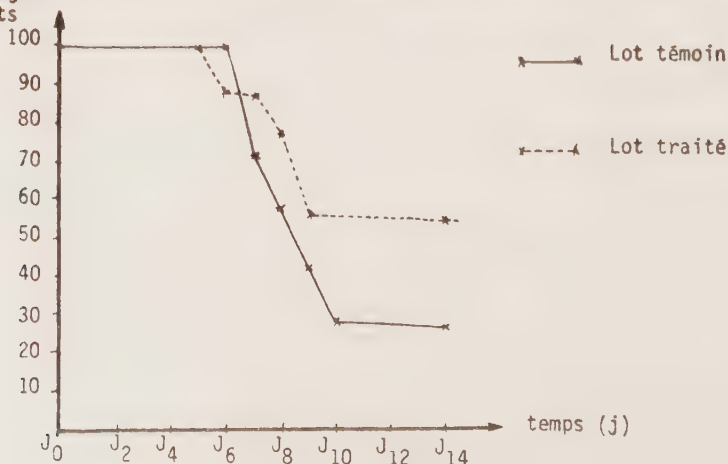
Dilution $\frac{1}{100}$	Nombre d'animaux	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	7	100	100	71	57	43	28	28	28	28	28
Lot traité préventivement	9	100	89	89	78	78	56	56	56	56	56

Tableau n° 8 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement préventif à dose double.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :

Pourcentage de survivants



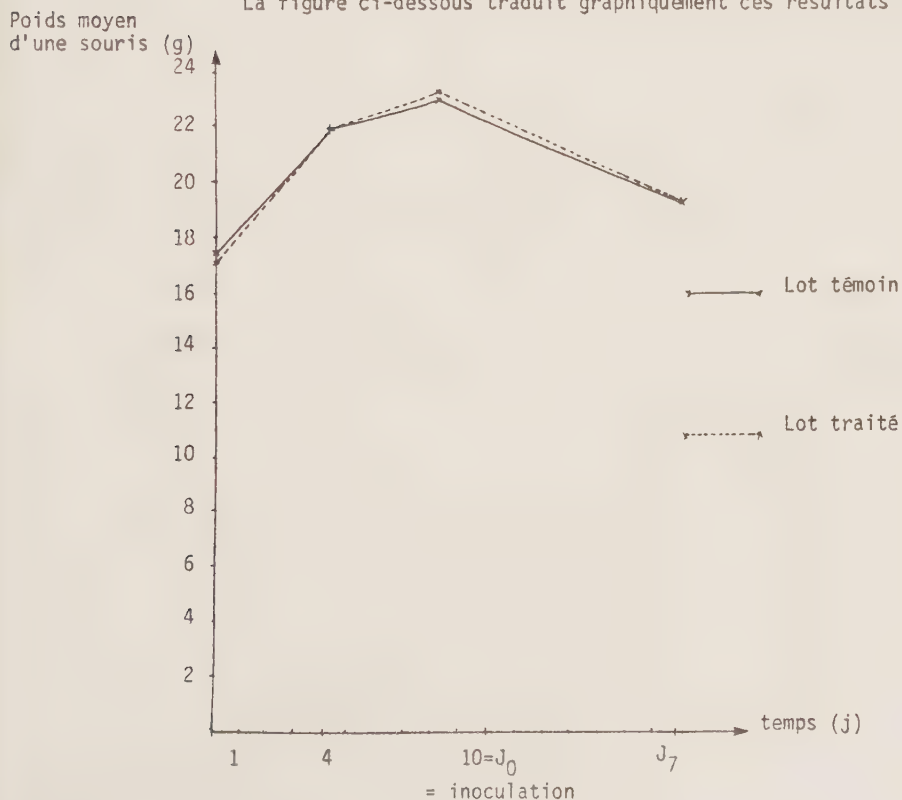
b. Examen pondéral

Dilution $\frac{1}{100}$	Poids moyen à l'arrivée par souris (g)	Poids moyen 4 j après l'arrivée par souris (g)	Poids moyen le jour de l'inoculation (J_0) par souris	Poids moyen à J_7 par souris (g) (nombre de souris)
Lot témoin, inoculé, non traité	17,7	22,1	23,4	19,5 (4)
Animaux inoculés et traités	17,3	22,1	23,6	19,5 (8)

Tableau n° 9 - poids moyen des souris (en g) à l'arrivée, 4 jours après l'arrivée, J_0 et J_7

Traitement préventif à dose double.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



II.3. TRAITEMENT CURATIF A DOSE SIMPLE

1) Dilution $\frac{1}{10}$ du virus

Nous avons fait deux fois cet essai.

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques à ceux décrits précédemment en cas de dilution $\frac{1}{10}$ du virus

* Mortalité

Dans le premier cas, les premières morts sont enregistrées le 5ème jour, pour les animaux témoins, le 6ème jour pour les animaux traités. Les dernières morts sont enregistrées le 8ème jour pour les animaux témoins, le 10ème jour pour les animaux traités.

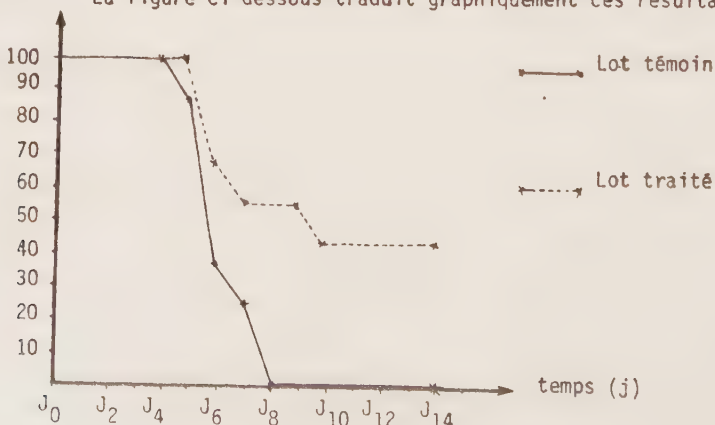
Dilution $\frac{1}{10}$	Nombre d'animaux	J ₄	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	8	100	87	37	25	0	0	0	0	0	0	0
Lot traité curativement	9	100	100	67	56	56	56	44	44	44	44	44

Tableau n° 10 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose simple.

Pourcentage de survivants

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



Dans le deuxième cas, les premières morts sont enregistrées le 5ème jour également, pour les animaux témoins et pour les animaux traités.

Les dernières morts sont enregistrées le 10ème jour pour les animaux témoins, le 7ème jour pour les animaux traités.

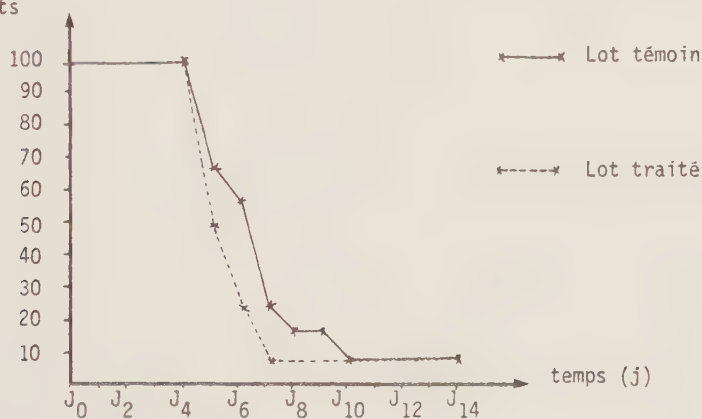
Dilution $\frac{1}{10}$	Nombre d'animaux	J ₄	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	12	100	67	58	25	17	17	8	8	8	8	8
Lot traité curativement	12	100	50	25	8	8	8	8	8	8	8	8

Tableau n° 11 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose simple.

Pourcentage de survivants

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



b. Examen pondéral

Le nombre d'animaux restant en vie étant insuffisant, cet examen n'a pas été réalisé.

2) Dilution $\frac{1}{100}$ du virus

Nous avons fait deux fois cet essai.

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques à ceux décrits précédemment en cas de dilution $\frac{1}{100}$ du virus

* Mortalité

Dans le premier cas, les premières morts sont enregistrées le 5ème jour pour les animaux témoins, le 7ème jour pour les animaux traités. Les dernières morts sont enregistrées le 8ème jour pour les animaux témoins, le 10ème jour pour les animaux traités.

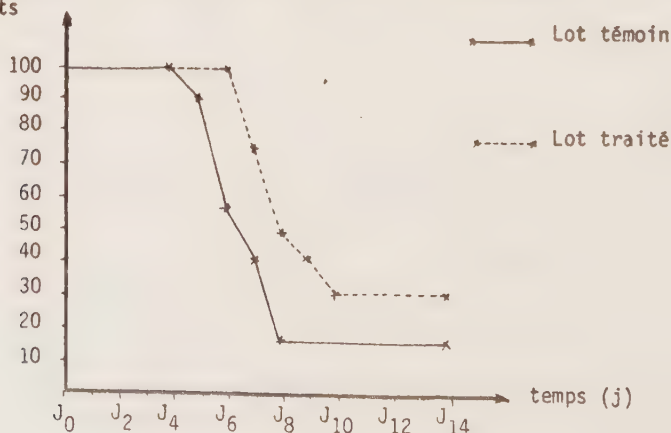
Dilution $\frac{1}{100}$	Nombre d'animaux	J ₄	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	12	100	92	58	42	17	17	17	17	17	17	17
Lot traité curativement	12	100	100	100	75	50	42	33	33	33	33	33

Tableau n° 12 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose simple.

Pourcentage de survivants

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



Dans le deuxième cas, les premières morts sont enregistrées le 7ème jour pour les animaux témoins et les animaux traités.
Les dernières morts sont enregistrées le 10ème jour pour les deux lots.

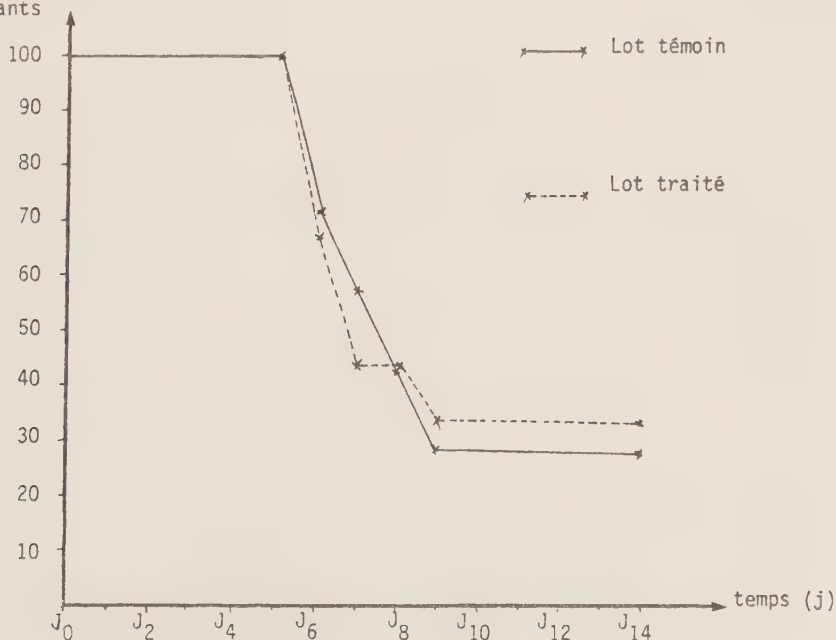
Dilution $\frac{1}{100}$	Nombre d'animaux	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	7	71	57	43	28	28	28	28	28	28
Lot traité curativement	9	67	44	44	33	33	33	33	33	33

Tableau n° 13 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose simple.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :

Pourcentage de survivants



b. Examen pondéral

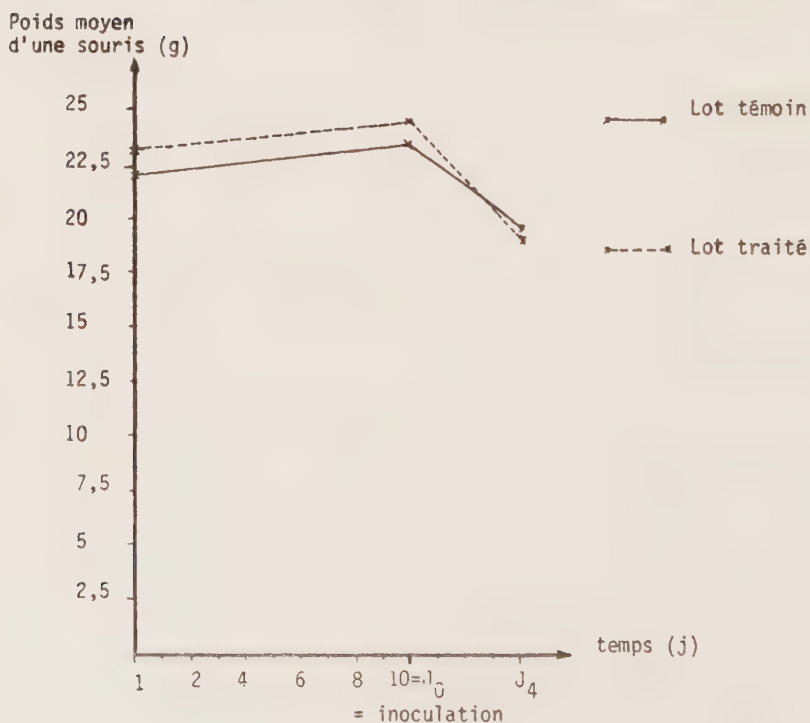
Dans le deuxième cas, nous avons obtenu les résultats suivants :

Dilution $\frac{1}{100}$	Poids moyen à l'arrivée par souris (g)	Poids moyen le jour de l'inoculation (J_0) par souris (g)	Poids moyen à J_4 par souris (g) (nombre de souris)
Lot témoin, inoculé, non traité	22,1	23,4	19,5
Animaux inoculés et traités	23,1	24,3	19,1

Tableau n° 14 - poids moyen des souris (en g) à l'arrivée, J_0 et J_7

Traitement curatif à dose simple.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



3) Dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques aux symptômes décrits à la dilution $\frac{1}{1000}$ avec le traitement préventif à dose simple.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 9ème jour pour les animaux témoins et pour les animaux traités.

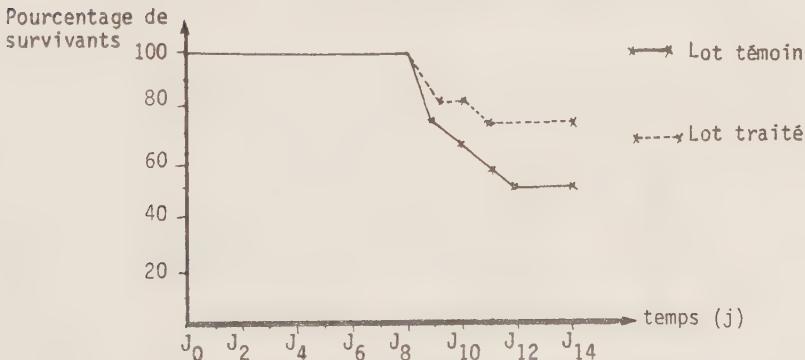
Les dernières morts sont enregistrées le 12ème jour pour les animaux témoins, le 11ème jour pour les animaux traités.

Dilution $\frac{1}{1000}$	Nombre d'animaux	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	12	100	75	67	58	50	50	50
Lot traité curativement	12	100	83	83	75	75	75	75

Tableau n° 15 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose simple.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



b. Examen pondéral

Il n'a pas été réalisé dans ce cas.

II.4. TRAITEMENT CURATIF A DOSE DOUBLE

Aucun examen pondéral n'a été réalisé dans ce cas.

1) Dilution $\frac{1}{10}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques aux symptômes décrits précédemment à la dilution $\frac{1}{10}$

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 5ème jour pour les animaux témoins et pour les animaux traités.

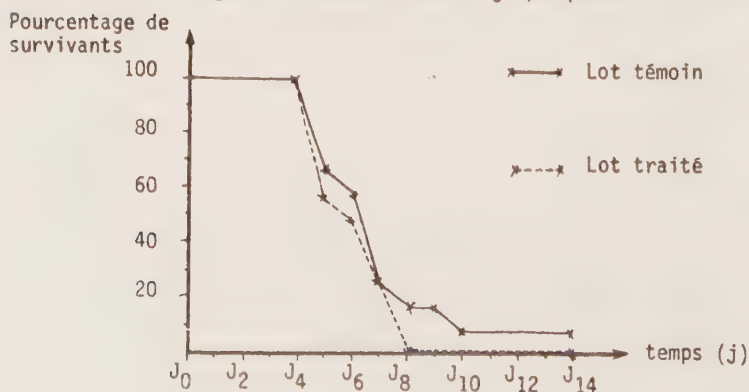
Les dernières morts sont enregistrées le 10ème jour pour les animaux témoins, le 8ème jour pour les animaux traités.

Dilution $\frac{1}{10}$	Nombre d'animaux	J ₄	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	12	100	67	58	25	17	17	8	8	8	8	8
Lot traité curativement	12	100	58	50	25	0	0	0	0	0	0	0

Tableau n° 16 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose double.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



2) Dilution $\frac{1}{100}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques à ceux décrits précédemment pour la dilution $\frac{1}{100}$

* Mortalité

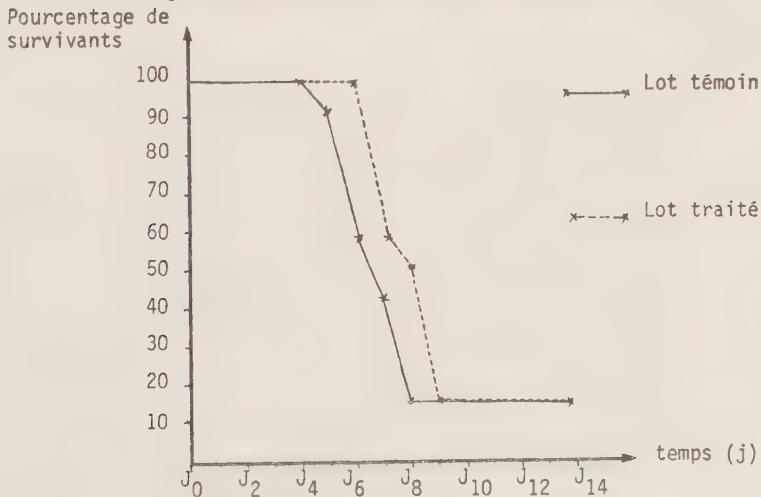
Les premières morts sont enregistrées le 5ème jour pour les animaux témoins, le 7ème jour pour les animaux traités. Les dernières morts sont enregistrées le 8ème jour pour les animaux témoins, le 9ème jour pour les animaux traités.

Dilution $\frac{1}{100}$	Nombre d'animaux	J ₄	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	12	100	92	58	42	17	17	17	17	17	17	17
Lot traité curativement	12	100	100	100	58	50	17	17	17	17	17	17

Tableau n° 17 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose double.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



3) Dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

a. Examen clinique

* Symptômes

Identiques à ceux décrits précédemment pour la dilution $\frac{1}{1000}$

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 9ème jour pour les animaux témoins et pour les animaux traités.

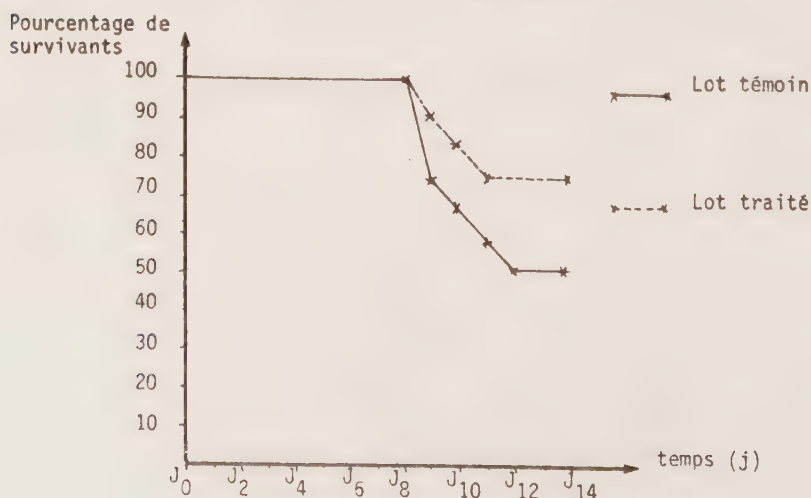
Les dernières morts sont enregistrées le 12ème jour pour les animaux témoins, le 11ème jour pour les animaux traités.

Dilution $\frac{1}{1000}$	Nombre d'animaux	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, non traité	12	100	75	67	58	50	50	50
Lot traité curativement	12	100	92	83	75	75	75	75

Tableau n° 18 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif à dose double.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



III. DISCUSSION

III.1. SYMPTOMES

Dans tous les cas, les symptômes observés sont identiques, à savoir :

- frilosité des animaux,
- poil terne et hirsute, yeux collés et gonflés, narines croûteuses,
- diminution de l'activité, anorexie, polypnée puis dyspnée,
- déshydratation des animaux avec persistance du pli de peau,
- perte de poids,
- mort.

III.2. MORTALITE

1) * Récapitulatif

Mortalité le 14ème jour, exprimée en pourcentage de survivants dans les différents essais.

Dilution du virus Lot	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$
Lot témoin	17	17	83
Lot traité préventivement à dose simple	10	40	70

Dilution du virus Lot	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$
Lot témoin	0	28
Lot traité préventivement à dose double	0	56

$\begin{array}{c} \text{Dilution du} \\ \text{virus} \\ \text{Lot} \end{array}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$
Lot témoin	0	8	28	17	50
Lot traité curativement à dose simple	44	8	33	33	75

$\begin{array}{c} \text{Dilution du} \\ \text{virus} \\ \text{Lot} \end{array}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{1000}$
Lot témoin	8	17	50
Lot traité curativement à dose double	0	17	75

2) * Influence de la dose employée

Dans aucun essai nous observons une différence entre les résultats obtenus avec des traitements à dose simple et à dose double. Donc, si on double la posologie préconisée par le fabricant, on observe :

- aucune toxicité particulière du produit
- aucun effet protecteur supérieur par rapport à la posologie recommandée.

La dose utilisée dans nos conditions expérimentales apparaît donc comme étant sans influence sur les résultats obtenus.

3) * Traitement préventif

- Dilution $\frac{1}{10}$ du virus

Le pourcentage de survivants est légèrement inférieur pour les lots traités que pour les lots témoins.

Aucun effet protecteur de la spécialité en traitement préventif à la dilution $\frac{1}{10}$ du virus n'est observé.

- Dilution $\frac{1}{100}$ du virus

Dans tous les cas le pourcentage de survivants est supérieur pour les lots traités.

Cependant, nous obtenons χ^2 égal à : - 0,07 à dose simple
- 0,02 à dose double

Les résultats obtenus ne sont donc pas significatifs, bien qu'une certaine protection des souris vis-à-vis de l'infection grippale soit enregistrée.

- Dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

Le pourcentage de survivants est légèrement supérieur pour le lot témoin.

Aucun effet protecteur de la spécialité en traitement préventif n'est observé à la dilution $\frac{1}{1000}$ du virus.

4) * Traitement curatif

- Dilution $\frac{1}{10}$ du virus

Le pourcentage de survivants est supérieur pour le lot traité dans le cas du traitement à dose simple ; par contre, les résultats sont inversés à dose double.

Nous ne pouvons donc pas conclure à un effet protecteur de la substance à la dilution $\frac{1}{10}$ du virus.

- Dilution $\frac{1}{100}$ du virus

Une légère protection des souris est observée lors du traitement à dose simple. Cependant, ces résultats ne sont pas significatifs et ne sont pas retrouvés lors du traitement à dose double.

Donc, aucun effet protecteur en traitement curatif n'est observé à la dilution $\frac{1}{100}$ du virus.

- Dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

Dans les deux cas le pourcentage de survivants est supérieur pour les lots traités.

Dans les deux cas, nous obtenons $\chi^2 = 0,71$.

Les résultats ne sont donc pas significatifs, bien qu'une certaine protection des souris vis-à-vis de l'infection grippale soit enregistrée.

III.3. EXAMEN PONDERAL

Dans tous les cas, nous obtenons des figures identiques : une perte de poids est enregistrée durant la semaine suivant l'inoculation. La deuxième semaine, par contre on note une reprise de poids parmi les souris encore vivantes.

Les poids moyens des souris à J_0 , J_7 et J_{14} sont tout à fait similaires pour les lots témoins, non traités et les lots traités.

Les courbes obtenues avec les différents résultats sont superposables dans tous les cas.

Le traitement avec la spécialité est donc sans influence sur le poids des souris inoculées avec le virus grippal.

III.4. AUTOPSIE

Dans tous les cas, on note une modification nette au niveau des poumons. Quelle que soit la dilution du virus utilisée, en cas de mortalité, les poumons sont très congestionnés, de couleur brun-violet et plus ou moins indurés.

Les résultats d'autopsie sont identiques pour les lots témoins, non traités, et les lots traités.

Le traitement avec la spécialité étudiée est donc sans influence sur les lésions observées en cas de mortalité.

AU BILAN,

Nous n'avons pas observé de différence nette entre les résultats obtenus avec les lots témoins inoculés, non traités et ceux obtenus avec les lots inoculés et traités.

Toutefois, une certaine tendance à la protection, bien que non significative, a été enregistrée lors des :

- traitement préventif à la dilution $\frac{1}{100}$ du virus
- traitement curatif à la dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

Afin de mieux quantifier ce pouvoir protecteur, il nous a paru intéressant de poursuivre les investigations en continuant les essais sur la sensibilité des souris au virus grippal particulièrement dans les deux cas cités ci-dessus avec des lots comportant un plus grand nombre d'individus.

DEUXIÈME PHASE : EPREUVE DE CONFIRMATION

Compte tenu des résultats obtenus dans la première partie de notre expérimentation, nous avons continué les essais sur la sensibilité des souris au virus grippal en utilisant des lots comportant un plus grand nombre d'individus.

Nous avons étudié les deux cas particuliers suivants, pour lesquels un éventuel effet protecteur était enregistré :

- traitement préventif, à la dilution $\frac{1}{100}$ du virus
- traitement curatif, à la dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux utilisés ainsi que l'infection virale ont les mêmes caractéristiques que dans l'essai précédent.

I.1. METHODOLOGIE

1) Distribution de la substance

Le protocole reste inchangé. La substance est distribuée dans l'eau de boisson. Une solution "neuve" est confectionnée chaque matin et est distribuée aux souris dans des biberons parfaitement rincés au préalable.

La dose utilisée est unique. En effet, aucune différence significative n'a été enregistrée entre les lots recevant des doses différentes de substance (cf. 1er temps de l'expérimentation). La spécialité est donc distribuée en solution à dose simple durant tout l'essai.

2) Réalisation des différents lots

Nous avons réalisé les lots suivants :

- A. Lot recevant la spécialité en traitement préventif, à dose simple
(1 ml de la préparation pour 499 ml d'eau de consommation).

Dilution du virus : $\frac{1}{100}$ - 39 souris

B. Lot témoin, non traité.

Dilution du virus : $\frac{1}{100}$ - 41 souris

C. Lot recevant la spécialité en traitement curatif, à dose simple
(1 ml de la préparation pour 499 ml d'eau de consommation)

Dilution du virus : $\frac{1}{1000}$ - 42 souris

D. Lot témoin, non traité.

Dilution du virus : $\frac{1}{1000}$ - 40 souris

II. RÉSULTATS

II.1. TRAITEMENT PREVENTIF, DILUTION $\frac{1}{100}$ DU VIRUS

1) Examen clinique

* Symptômes :

Ils sont identiques aux symptômes décrits dans la 1ère phase de l'expérimentation.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 5ème jour pour les animaux traités, le 6ème jour pour les animaux témoins.

Les dernières morts sont enregistrées le 10ème jour pour les animaux traités, le 13ème jour pour les animaux témoins.

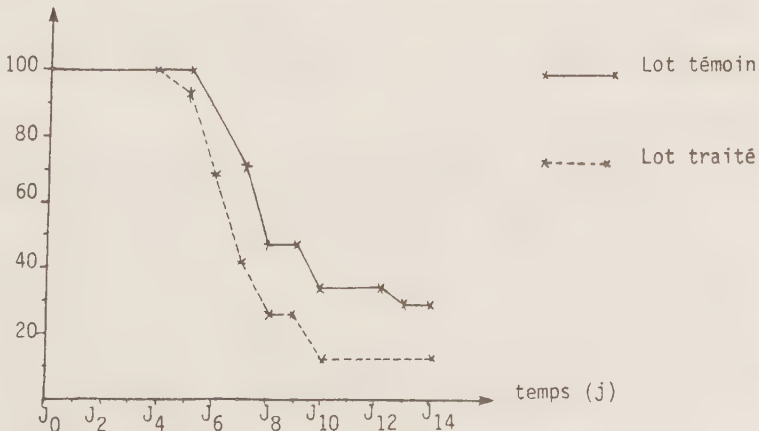
Dilution $\frac{1}{100}$	Nombre d'animaux	J ₅	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, inoculé, non traité	41	100	85	73	46	46	34	34	34	29	29
Lot traité préventivement	39	95	72	41	26	26	13	13	13	13	13

Tableau n° 19 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement préventif.

Pourcentage de survivants

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :

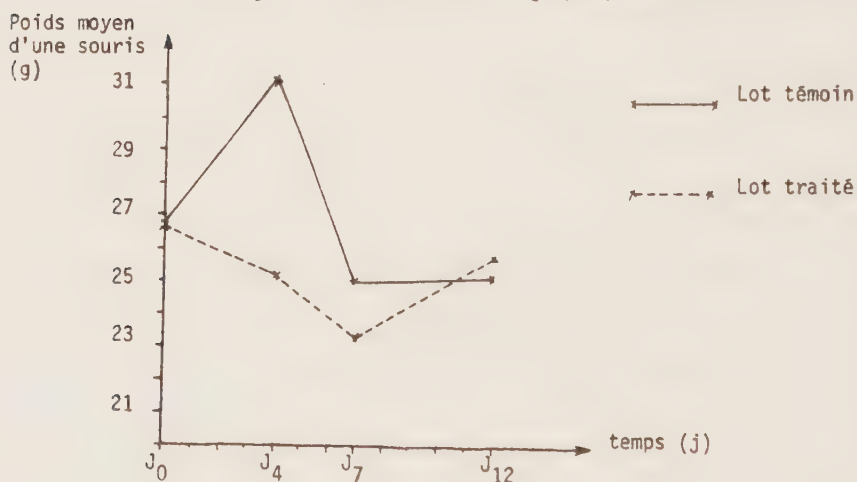


2) Examen pondéral

Dilution $\frac{1}{100}$	Poids moyen à J ₀ par souris (nombre de souris)	Poids moyen à J ₄ par souris (nombre de souris)	Poids moyen à J ₇ par souris (nombre de souris)	Poids moyen à J ₁₂ par souris (nombre de souris)
Animaux témoins, inoculés et non traités	26,9 (41)	31,4 (41)	24,9 (29)	25,1 (14)
Animaux inoculés et traités	26,7 (39)	25,2 (39)	23,2 (16)	25,8 (5)

Tableau n° 20 - poids moyen des souris à J₀, J₄, J₇ et J₁₂ (en g)
Traitement préventif.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



3) Résultat d'autopsie

Comme dans la première partie, on note uniquement une modification au niveau des poumons. On note de nombreux foyers congestionnés de couleur brun violet et des foyers d'induration.

II.2. TRAITEMENT CURATIF, DILUTION $\frac{1}{1000}$ DU VIRUS

1) Examen clinique

* Symptômes

Ils sont identiques aux symptômes décrits dans la première partie de l'expérimentation.

* Mortalité

Les premières morts sont enregistrées le 7ème jour pour les animaux témoins et pour les animaux traités curativement.

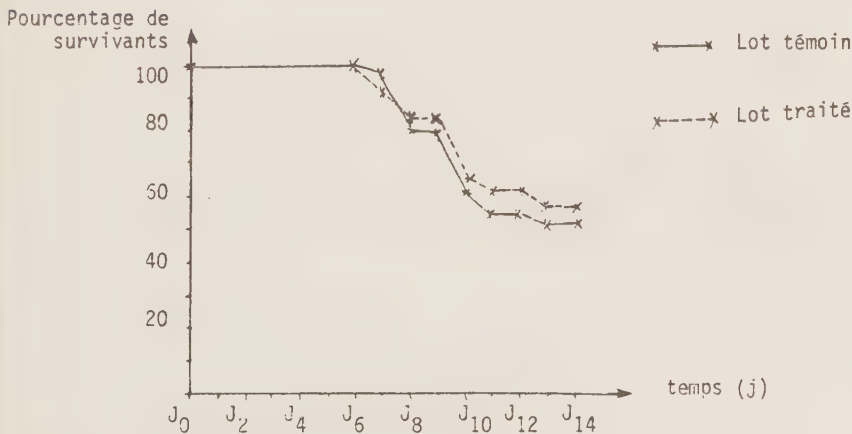
Les dernières morts sont enregistrées le 13ème jour pour les deux lots.

Dilution $\frac{1}{1000}$	Nombre d'animaux	J ₆	J ₇	J ₈	J ₉	J ₁₀	J ₁₁	J ₁₂	J ₁₃	J ₁₄
Lot témoin, inoculé, non traité	40	100	97,5	80	80	60	55	55	52,5	52,5
Lot traité curativement	42	100	93	83	83	67	62	62	57	57

Tableau n° 21 - mortalité en fonction du temps, exprimée en pourcentage de survivants.

Traitement curatif.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :

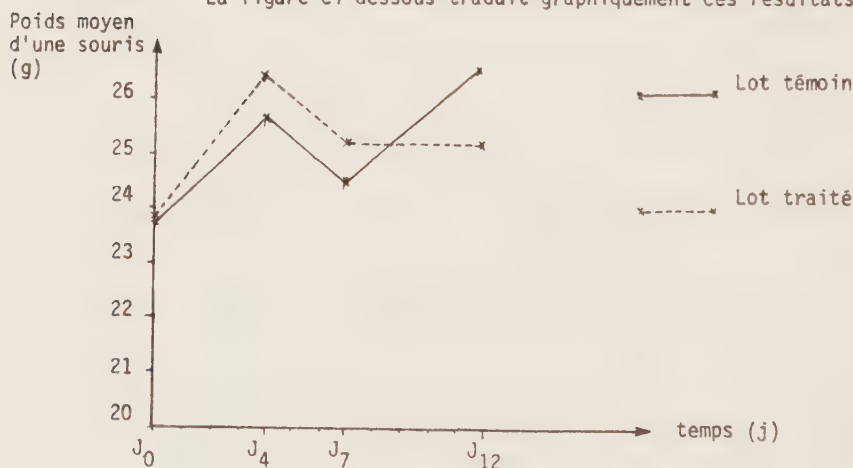


2) Examen pondéral

Dilution $\frac{1}{1000}$	Poids moyen à J ₀ par souris (nombre de souris)	Poids moyen à J ₄ par souris (nombre de souris)	Poids moyen à J ₇ par souris (nombre de souris)	Poids moyen à J ₁₂ par souris (nombre de souris)
Animaux témoins, inoculés et non traités	23,7 (40)	25,8 (40)	24,5 (39)	26,6 (22)
Animaux inoculés et traités	23,8 (42)	26,5 (42)	25,2 (39)	25,2 (26)

Tableau n° 22 - poids moyen des souris à J₀, J₄, J₇, J₁₂ (en g)
Traitement curatif.

La figure ci-dessous traduit graphiquement ces résultats :



3) Résultat d'autopsie

Les résultats sont identiques à ceux observés au cours de la première partie de l'expérimentation.

III. DISCUSSION

III.1. SYMPTOMES

Les symptômes observés sont identiques, que les animaux soient traités ou non.

III.2. MORTALITE

1) Récapitulatif

Mortalité enregistrée le 14ème jour, exprimée en pourcentage de survivants, dans les différents essais :

Lot témoin	29
Lot traité préventivement	13

Dilution $\frac{1}{100}$ du virus

Lot témoin	52,5
Lot traité curativement	57

Dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

2) Utilisation de la spécialité en traitement préventif

Le pourcentage de survivants est légèrement inférieur pour les lots traités que pour les lots témoins. La mortalité a débuté chez les animaux traités 24 heures plus tôt que chez les animaux témoins. Aucun effet protecteur de la spécialité aromathérapique en traitement préventif (à la dilution $\frac{1}{100}$ du virus) n'est observé dans ce cas.

3) Utilisation de la spécialité en traitement curatif

Le pourcentage de survivants est légèrement supérieur pour les lots traités que pour les lots témoins.

Cependant, lors de l'étude statistique nous obtenons $\chi^2 = 0,04$

Les résultats obtenus ne sont donc pas significatifs.

Aucun effet protecteur de la spécialité aromathérapique en traitement curatif (à la dilution $\frac{1}{1000}$ du virus) n'est observé.

III.3. EXAMEN PONDERAL

Les figures obtenues sont identiques à celles de la 1ère phase de l'expérimentation : on observe d'abord une légère perte de poids pour tous les animaux ; cette perte de poids est plus importante dans le cas de la dilution $\frac{1}{100}$ du virus, ce qui correspond à la plus forte concentration en virus utilisée durant cet essai. En fin d'expérimentation, on note à nouveau un gain de poids parmi les animaux survivants.

Les poids moyens des souris à J₀, J₄, J₇ et J₁₂ sont tout à fait similaires pour les lots témoins non traités et les lots traités.

Une très légère différence peut cependant être notée à J₄ dans le cas du traitement préventif, à la dilution $\frac{1}{100}$: on enregistre un gain de poids pour les souris témoins et une perte de poids pour les souris traitées. On peut rapprocher ceci du fait que les premières morts apparaissent plus tardivement dans cet essai pour les souris témoins ; l'atteinte pulmonaire s'est faite plus rapidement chez les souris traitées.

On enregistre donc en aucun cas une différence de poids favorable aux souris traitées.

Le traitement avec la spécialité aromatique est donc sans influence sur le poids des souris soumises à une infection grippale aiguë.

III.4. AUTOPSIE

Les résultats obtenus sont identiques à ceux décrits dans la première phase. Les lésions observées sont les mêmes, que les animaux soient traités ou non.

Au bilan, nous n'avons noté aucune différence entre les lots témoins inoculés, non traités et les lots inoculés et traités préventivement ou curativement avec la spécialité étudiée.

Ces résultats, obtenus à partir de lots comportant 40 animaux, sont bien en accord avec ceux rapportés dans la première phase de l'expérimentation. Quelle que soit la dilution de virus utilisée, la spécialité n'a donc pas exercé d'effet protecteur, qu'elle soit administrée en traitement préventif ou en traitement curatif.

Nous pouvons donc conclure que la spécialité étudiée, dans nos conditions expérimentales, est sans effet sur la sensibilité de la souris vis-à-vis d'une infection grippale aiguë. Il faut cependant rappeler que la substance est administrée par voie orale ; une administration par voie respiratoire (en utilisant un aérosol par exemple) aurait peut-être conduit à des observations différentes. D'autre part, l'infection virale choisie était une infection aiguë, même dans le cas de la plus forte dilution du virus.

Nous retiendrons donc que la préparation est sans effet dans notre étude, certes, mais en précisant que l'expérimentation s'est déroulée selon un protocole bien particulier : administration de la substance per os, à des souris soumises à une infection grippale aiguë.

Bien que le modèle décrit dans cette expérimentation nous paraisse adapté à l'étude de cette spécialité, nous pourrions maintenant prévoir de tester celle-ci :

- in vivo, sur une bactérie à tropisme respiratoire
- in vitro également, sur des cultures cellulaires par exemple.

CONCLUSIONS

Après avoir rappelé des données générales sommaires sur l'aromathérapie, nous avons réalisé l'étude d'une préparation constituée d'huiles essentielles.

Cette étude a porté :

- d'une part, sur l'analyse de la spécialité,
- d'autre part, sur la mise en évidence d'éventuels effets protecteurs sur des souris infectées expérimentalement par un virus grippal : Myxovirus influenzae de type A, inoculé selon trois dilutions différentes :

$$\frac{1}{10} , \frac{1}{100} , \frac{1}{1000}$$

La substance a été distribuée dans l'eau de boisson à deux doses : une dose simple et une dose double de celle préconisée par le fabricant.

Dans une première série d'essais, nous avons montré :

- que la dose est sans influence sur les résultats obtenus,
- que la spécialité ne montre pas d'effet protecteur sur les souris inoculées expérimentalement. Cependant, dans deux cas :

- traitement préventif, à la dilution $\frac{1}{100}$ du virus

- traitement curatif, à la dilution $\frac{1}{1000}$ du virus

les résultats obtenus, bien que non significatifs, donnent un certain effet protecteur.

Une deuxième série d'essais, réalisés sur un nombre plus important d'animaux, infirme ces résultats et montre l'absence d'effet protecteur de la préparation étudiée, dans nos conditions expérimentales.

En effet, pour toutes les dilutions de virus, nous n'avons obtenu aucune différence significative entre les lots témoins et traités, en ce qui concerne l'évolution clinique (symptômes, mortalité), les courbes pondérales et le tableau lésionnel.

En conséquence, nous pouvons conclure que la spécialité aromathérapique étudiée n'exerce aucun effet sur des souris soumises à une infection grippale expérimentale aiguë. Cependant, nos résultats ont été obtenus sur un modèle particulier et il serait certainement souhaitable, pour apprécier de façon plus complète un éventuel effet protecteur de la préparation, de pouvoir étudier celle-ci selon d'autres modalités, par exemple in vivo sur une bactérie ou in vitro sur des cultures lymphocytaires.

Vu :

LE DIRECTEUR

de l'École Nationale Vétérinaire de Lyon.

Mme :

LE DOYEN

LE PROFESSEUR RESPONSABLE

de l'École Nationale Vétérinaire.

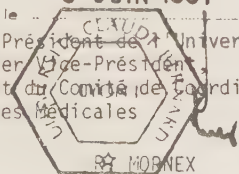
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu et permis d'imprimer

5 JUIN 1981

LYON le ... 19

Pour le Président de l'Université LYON I
Le Premier Vice-Président
Président du Comité de Coordination
des Etudes Médicales



MODNEX

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - BELAICHE (P.)
Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome 1. L'Aromatogramme.
Maloine S.A. - 1979.
- 2 - BEZANGER-BEAUQUESNE (L.) ; PINKAS (M.) ; TORCK (M.)
Les plantes dans la thérapeutique moderne.
Maloine S.S. - Paris - 1975.
- 3 - BEZANGER-BEAUQUESNE (L.) ; PINKAS (M.) ; TORCK (M.) ; TROTIN (F.)
Plantes médicinales des régions tempérées.
Maloine S.A. - 1980.
- 4 - DEBELMAS (A.M.) ; ROCHAT (J.)
Bull. Trav. Soc. Pharm. - LYON - 1964, 8, 163-172.
- 5 - DURAFFOURD (C.) ; LAPRAZ (J.C.)
Traitement du terrain.
dans Compte Rendu du 2ème congrès international de Phytothérapie et
d'Aromathérapie ; Monte Carlo - 1977.
- 6 - DURAFFOURD (C.) ; LAPRAZ (J.C.)
Apport de la clinique dans l'utilisation des huiles essentielles en
thérapeutique humaine.
dans Compte Rendu du 2ème colloque international des plantes médicinales,
Faculté de Pharmacie, Angers, Mai 1978.
- 7 - VALETTE (L.)
Un nouvel excipient huileux hydrophyle.
Thèse Doc. Vét. Lyon, 1957.
- 8 - VALNET (J.)
Traitement des maladies par les plantes - Phytothérapie - 4ème édition.
Maloine S.A. - 1979.

9 - VALNET (J.)

Aromathérapie : traitement des maladies par les essences des plantes.

9ème édition.

Maloine S.A., 1980.

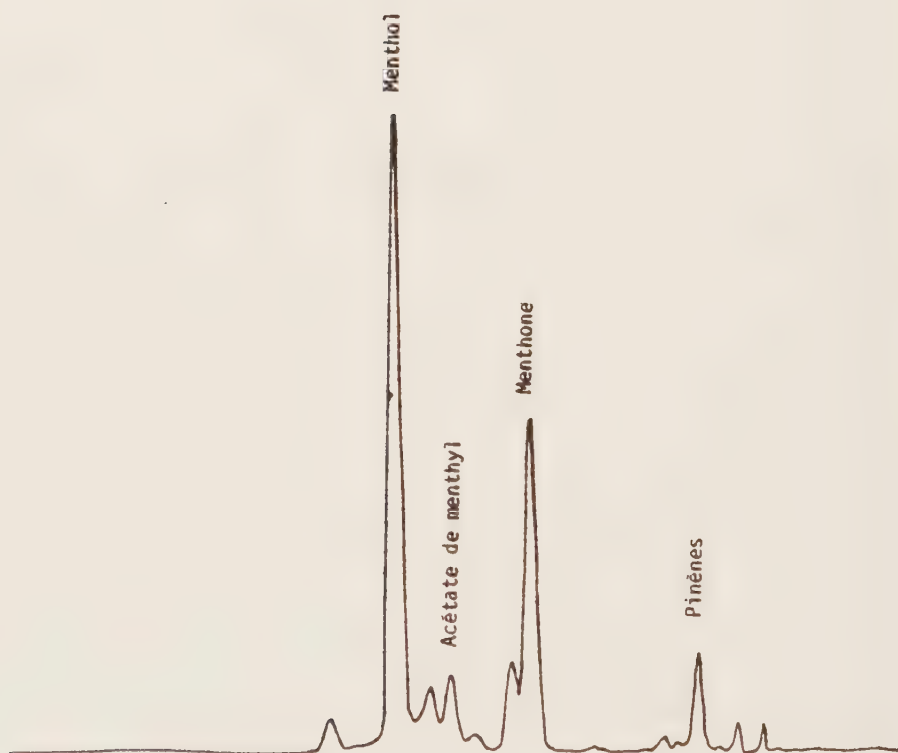
10 - VALNET (J.) ; DURAFFOURD (C.) ; LAPRAZ (J.C.)

Phytothérapie et Aromathérapie.

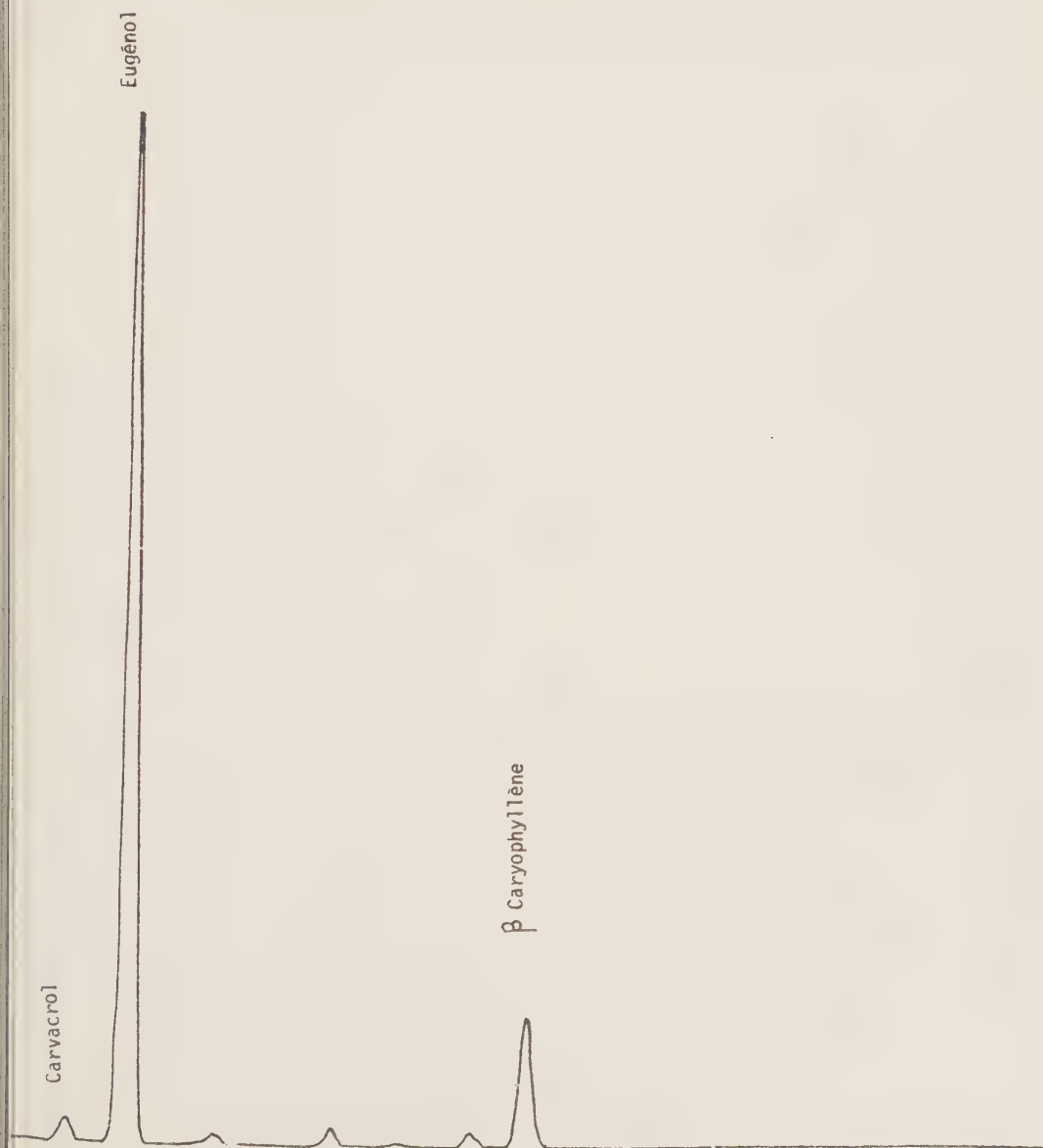
Presses de la Renaissance - 1978.

ANNEXE N° 1

Chromatogramme de l'huile essentielle de menthe



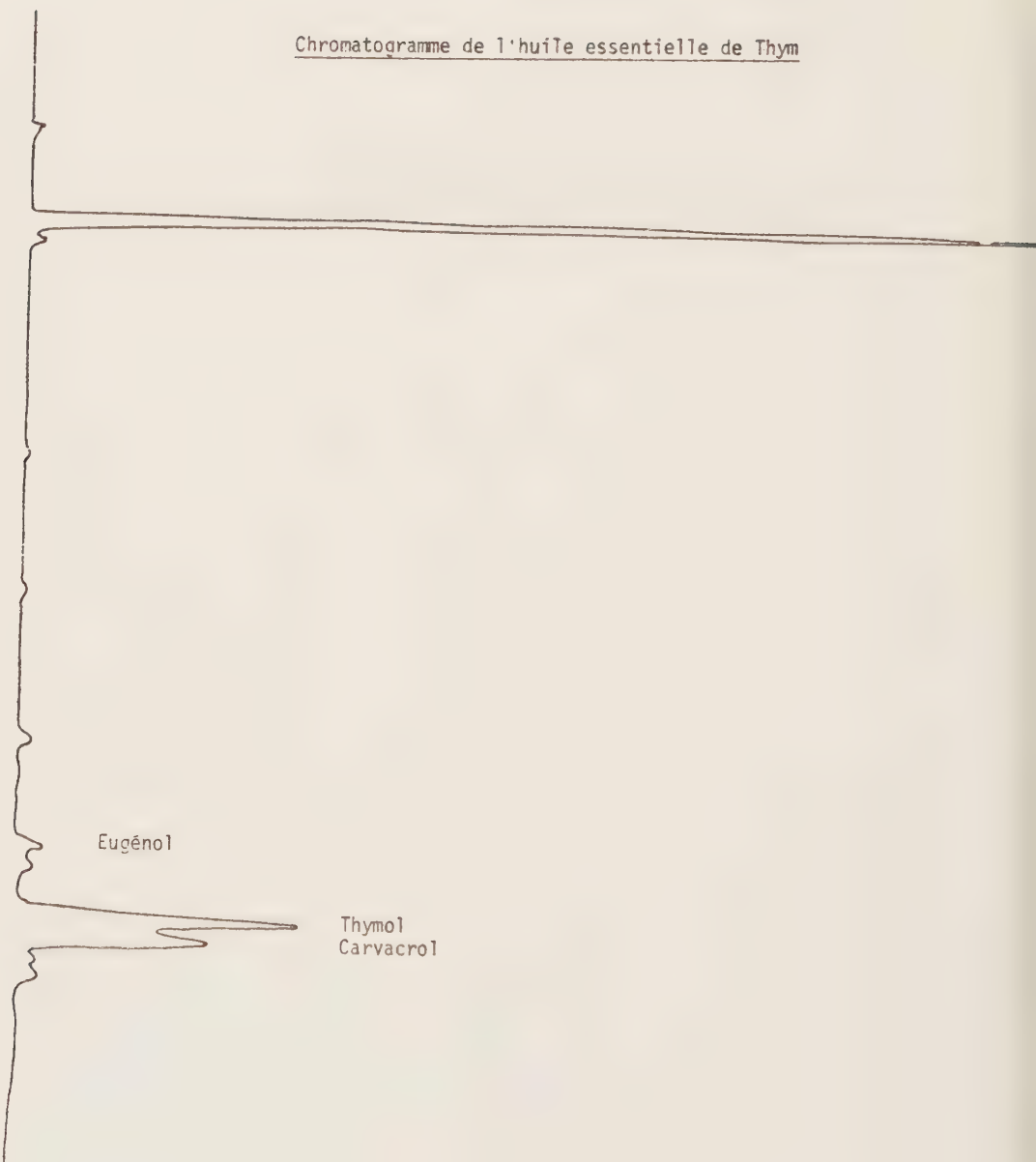
Chromatogramme de l'huile essentielle de Girofle



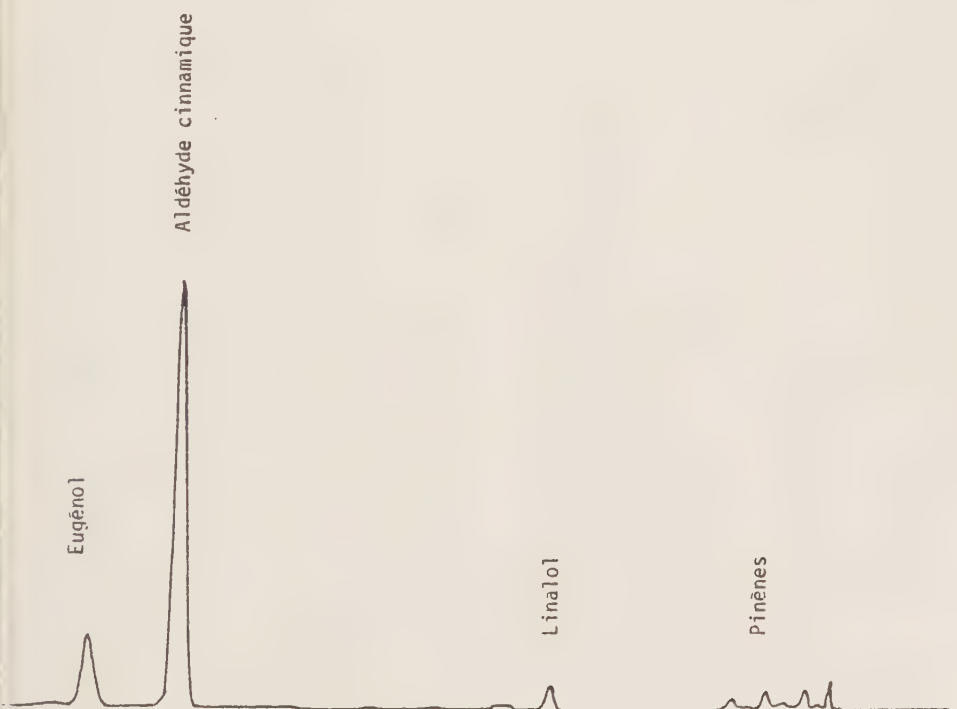
Chromatogramme de l'huile essentielle de Thym

Eugéno1

Thymo1
Carvacro1



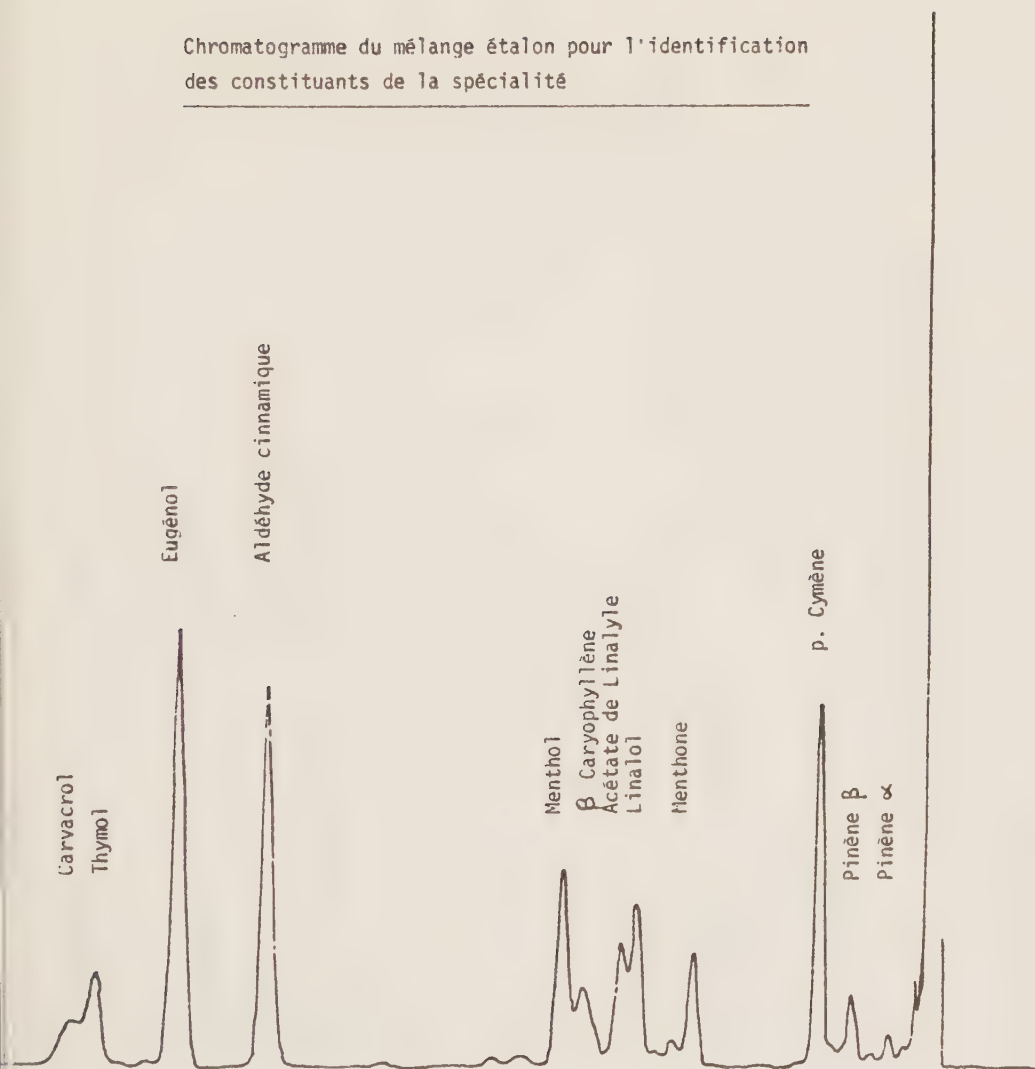
Chromatogramme de l'huile essentielle de Cannelle



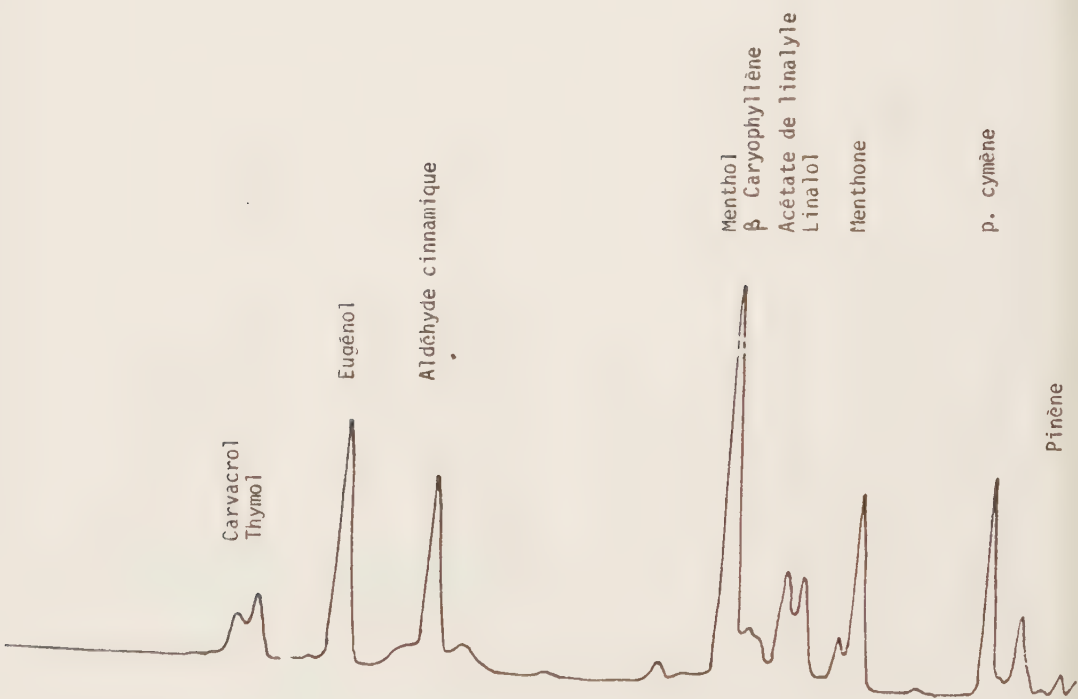
Chromatogramme de l'huile essentielle de Lavande



Chromatogramme du mélange étalon pour l'identification
des constituants de la spécialité



Chromatogramme de la spécialité



I. C. VAUBECOUR
l'Imprimerie des étudiants lyonnais
11 et 13 Rue Vaubecour
LYON 69002 - Tél. 42 - 45 - 85



ANNUAIRE ET PHARMACOLOGIQUE

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

ANNUAIRE DES ÉCRIVAINS

I. C. VAUBECOUR

l'Imprimerie des étudiants lyonnais.

11 et 13 Rue Vaubecour
LYON 69002 - Tél. 42-45-85

SOUS-DELA
LYON